

**Konditionelle Genausschaltung
in der Maus:
Effektive Steuerung durch ein kombiniertes
Regulationssystem**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Markus Köster
aus Damme

1. Referent: Prof. Dr. T. Braun

2. Referent: Prof. Dr. R. Schnabel

eingereicht am: 05.11.1998

mündliche Prüfung (Disputation) am: 29.01.1999

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Köster, M., Kaul, A. & Braun, T.: Establishment of a cell-type specific and conditional active recombination system in mice in vivo. (Vortrag im Rahmen eines Workshops) 12. Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie, Köln (1997).

Köster, M. & Braun, T.: Towards a cell-type specific and conditional active recombination system in mice in vivo. (Poster) Mouse Molecular Genetics Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1998).

Between the fifth and the tenth day the lump of stem cells differentiates into the overall building plan of the [mouse] embryo and its organs. It is a bit like a lump of iron turning into a space shuttle. In fact it is the profoundest wonder we can still imagine and accept, and at the same time so usual that we have to force ourselves to wonder about the wondrousness of this wonder.

M. Holub (1990)

Hence, we cannot categorically deny that perhaps we may be able to grind genes in a mortar and cook them in a beaker after all.

H. J. Muller (1922)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Freunden, Bekannten und Kollegen bedanken, die mir - auf jeweils ihre Art und Weise - zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. T. Braun, nicht nur für die Bereitstellung des interessanten Themas, sondern vor allem für seine hervorragende Betreuung und steten Rat. Darüber hinaus sei ihm ganz herzlich für die Übernahme der Blastozysten-Injektionen gedankt.

Herrn Professor Dr. R. Schnabel und Frau Professorin Dr. B. Jockusch sei für ihre Übernahme des Co-Referats bzw. der Teilnahme an der Prüfungskommission gedankt.

Ferner geht mein Dank an den Boehringer-Ingelheim-Fonds, Stiftung für medizinische Grundlagenforschung, für die finanzielle Unterstützung der Promotion in den Jahren 1994-1997, sowie für die Finanzierung zweier Kongreßteilnahmen. Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Monika Beutelspacher und Herrn Dr. Hermann Fröhlich für ihre stete Unterstützung und ihren Rat bedanken.

Einen großen Anteil an dem Gelingen an der vorliegenden Arbeit haben die Mitglieder der Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Braun gehabt: Ein herzliches Dankeschön für die sehr gute Laboratmosphäre gehen an Konstanze Schäfer (alte Liebe rostet nicht), Axel Kaul, Stefanie Willenzon (gepunktet-ebenfalls vielen Dank für Blastozysten-Injektionen), Astrid Grudziecki (Käffchen Zweitausend), Yvonne Pooch (Mäusepflege), Patrizia Gatzlaff, Silke Heymann, Annette Borck, Detlev Mennerich (für alle IT-Fragen: Was wäre ich ohne Dich?) sowie Marcus Krüger.

Für die Einweisung in diverse Arbeitstechniken, für kollegialen und freundschaftlichen Rat geht mein Dank an Dr. Robert Zweigerdt (altes Haus), Dr. Thorsten Hadrys, Dr. Silke Rinkwitz-Brandt, André Schneider, Dr. T. Floß sowie (last but not least) an Dr. Sabine Hornung. Ein dickes Bussi geht auch jeweils an Frau Charlotte Klaue und Frau Lore Faust (für die Dinge zwischen den Zeilen).

Darüber hinaus sei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Prof. Dr. Arnold und PD Dr. Eva Bober für die schönen Stunden im und ums Labor gedankt.

Ferner geht mein Dank an meine Eltern, Hermann und Monika Köster, sowie an meine Schwestern Susanne und Anja, dafür, daß sie immer da waren, wenn ich sie brauchte, und mir zwischendurch „Asyl“ gewährten.

Für das „so wichtige Drumherum“ der schönen Promotionszeit geht mein Dankeschön an Thomas (Catkle) Müller, Tomaz Schellenberger, Susa, Frank Lücke, Frank Schröder, Westi, Wolli, Sue, den Orgis vom Sommerloch, allen voran Paru, Astrid, Jan; Daniel, Norbert und Steffi, Sigrünchen und Cowboy, Heinke und Olly, Kathy, Felix, Kaily und Konsorten, dem Steffen, Jimmy, Goedi, meinen Malermentor Thomas Berger, den treuen Mitgliedern des Malkursus, Rainer und Gitti, Olli und Utchen, Susan, Knud, den Bültengeweg 8, Annette und Carsten, Birte, Marc, Frank (Dr. K.) Kuhnert, Latent-Dirk-chen, Lui-Pups, Frau Tegtmeyer, und allen, allen, die mit denen ich in den letzten Jahren freundschaftlich verbunden war, und die ich allzuoft vernachlässigen mußte, weil ich Tag und Nacht im Labor herumhing (im nächsten Leben - for sure auch für Dich, P-Stephi (roechel)). Ich liebe Euch.

Prolog

Welche Mechanismen steuern die Entwicklung von einer befruchteten Eizelle zu einem komplexem Organismus? Dieses Problem stellt die zentrale Frage der modernen Entwicklungsbiologie dar. Noch vor ca. 20 Jahren enthielt die Landkarte der Entdeckungen auf diesem Forschungsgebiet fast nur weiße Flecken und auch heute sind viele Rätsel ungelöst. Nichtsdestotrotz hat sich die Menschheit schon seit den Tagen der „alten Griechen“ Gedanken zu diesem Thema gemacht. Aristoteles unterschied z.B. zwischen *animalia vivipara*, *animala ovipara* und *animala sponte nascenta*, wobei letztere „spontan aus dem Schlamm eines ausgetrockneten Gewässers nach einem Regenguß“ entstehen sollten.

Mit der Entdeckung des Mikroskops und anderer Werkzeuge wurde den „Naturforschern“ des 17. Jahrhunderts ein Mittel zur Hand gegeben, den entwicklungsbiologischen Vorgängen ein wenig genauer „auf’s Auge zu schauen“. Ganz vom gesellschaftlichen Hintergrund abhängig wurden die ersten Theorien zu der Entstehung und Ausführung der Baupläne der Tiere und Pflanzen aufgestellt. Der Inhalt dieser war aber eher als Glaubensbekenntnis denn als wissenschaftliche Arbeit zu verstehen und war sehr von den religiösen und politischen Machtverhältnissen der damaligen Zeit geprägt. Die Entstehung von Leben und Lebensformen gehörte in einen Bereich, der sehr stark von Metaphysik und Religion bestimmt war.

„Im 17. und 18. Jahrhundert herrschten noch die unklarsten Vorstellungen über das Wesen des tierischen Entwicklungsprozesses. Von den religiösen Dogmen ihrer Zeit beeinflusst, waren die bedeutensten Anatomen und Physiologen mit wenigen Ausnahmen der Ansicht, daß der Keim oder der erste Jugendzustand eines Organismus nichts anderes als ein außerordentlich verkleinertes Miniaturbild vom späteren ausgebildeten Zustand darstelle. [...] Da es nun aber mit den Vergrößerungsgläsern, welche schon damals als Instrumente der Forschung in Gebrauch gekommen waren, nicht möglich war, die zahlreichen vorausgesetzten Organe im Ei am Anfang seiner Entwicklung zu sehen und nachzuweisen, nahm man zu der Hypothese seine Zuflucht, daß die einzelnen Teile, wie Nervensystem, Knochen, Drüsen etc., in den ersten Stadien der Entwicklung nicht nur außerordentlich klein, sondern dabei auch vollkommen durchsichtig seien.“ (Hertwig, 1904)

Mit der Aufklärung des 18. Jahrhunderts erfuhr die Entwicklungsbiologie zusammen mit den anderen Naturwissenschaften einen gehörigen Aufschwung. Sie verlor gleichzeitig die Aufgabe, politische oder religiöse Machthaber mit Argumenten für ihren „Status quo“ zu versorgen.. In Deutschland wurde die Entwicklungsbiologie durch die Arbeiten von Ernst Haeckel (1834-1919) bekannt, der z.B. die Hypothese, nach der die Ontogenie die Phylogenie wiederhole, zum Paradigma der Entwicklungsbiologie erhob.

„Unsere moderne Entwicklungslehre, deren feste Begründung wir als einen der bedeutendsten Kulturfortschritte des neunzehnten Jahrhundert feiern, hat uns zu der sicheren Erkenntnis geführt, daß alle Erscheinungen der Natur wie im Menschenleben aus einfachsten Anfängen sich allmählich entwickelt haben. Sie hat uns ferner überzeugt, daß der Mensch - seinem ganzen Körperbau und seinen Lebenserscheinungen nach ein echtes Wirbeltier, und zwar ein plazentales Säugetier - aus diesem Stamme entsprungen ist.“ (Haeckel, 1913)

Inzwischen lagen über die Entwicklungsgeschichte (Embryologie) schon umfangreiche deskriptive Werke vor, etwa „Über die Entwicklungsgeschichte der Thiere“ von C.E. von Baer (1792-1876).

„Die Entwicklungsgeschichte ist der wahre Lichtträger für Untersuchungen über organische Körper.“ (von Baer, 1849).

Gegen Ende des Jahrhunderts verlagerten sich die Schwerpunkte innerhalb der entwicklungsbiologischen Forschung. Die kausalen Vorgänge der Umbildungen vom Ei bis zum Erwachsenen rückten in den Vordergrund des Interesses. W.Roux (1850-1924) ging dieser Frage experimentell nach und begründete die Entwicklungsphysiologie.

„Das embryonale Geschehen findet offenbar statt wie die Ausführung von Submissionsarbeiten; z.B. eines Baues, für welchen Material, Größe, Gestalt [und] innere Einrichtung [...] normiert wird. Dagegen ist vieles in der Einzelausführung z.B. die Lagerung der einzelnen Steine [...], ihre Zusammensetzung dem Unternehmer und seinen Gehülfen frei überlassen, wenn sie nur so geschieht, dass sie die bedungene Function zu verrichten vermögen.“ (Roux, 1881)

Der Beginn des 20. Jahrhunderts war von rapiden Fortschritten innerhalb der „klassischen“ Entwicklungsbiologie geprägt. Hervorzuheben sind die Arbeiten von Thomas H. Morgan (1866-1945), dessen Arbeiten über *Drosophila melanogaster* bahnbrechend auf dem Gebiet der Genetik waren.

„Our present conception of the relations of the germplasm to developmental phenomena has then only a most superficial resemblance to the older theories. The newer point of view may be summed up in a few words, and has in fact been stated already. First, that each gene may have manifold effects on the organism, and second, that every part of the body, and even each particular character, is the product of many genes.“ (Morgan, 1919)

Ein weiterer einflußreicher Vertreter war Hans Spemann, dessen Arbeiten an Salamander-Embryonen z.B. erste Hinweise über die entwicklungsbiologischen Mechanismen während der Gastrulation lieferten und schließlich mit dem ersten Nobelpreis auf dem Gebiet der Entwicklungsbiologie belohnt wurden.

„Als Vorbild [für einen Entwicklungsbiologen] schwebt mir dabei die Arbeitsweise eines Archäologen vor, der aus den Bruchstücken, die allein er in Händen hält, ein Götterbild wieder zusammenfügt. Er muß an das Ganze glauben, das er nicht kennt; aber er darf nicht nach eigenen Gedanken gestalten. Er muß selbst soweit Künstler sein, daß er den Plan des hohen Meisters schrittweise nachschaffen kann; aber sein oberstes Gebot ist, die 'Bruchflächen' heilig zu halten. Nur so darf er hoffen, neue Funde an ihrem richtigen Orte einfügen zu können.“ (Spemann, 1936)

Die Mitte des 20. Jahrhunderts wurde es etwas ruhiger um die entwicklungsbiologische Forschung. Es bedurfte zunächst neuer Untersuchungsmethoden und Entdeckungen, ehe ein neuer Erkenntnisschub einsetzen konnte. Ausgehend von den späten Siebziger Jahren dieses Jahrhunderts setzte dann aber ein Höhenflug in der Entwicklungsbiologie ein, der bis heute ungebrochen ist.

Ausgangspunkt der „molekularen Entwicklungsbiologie“ bildeten Untersuchungen an bestimmten, sogenannten homöotischen Mutationen in *Drosophila melanogaster*, die an sich schon vor über 100 Jahren von William Bateson entdeckt wurden (Bateson, 1894). Ed B. Lewis und Walter Gehring machten sich hier vor allem nach dem zweiten Weltkrieg verdient. Hervorzuheben sind die Arbeiten von Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus, die das Genom von *D. melanogaster* systematisch nach Mutationen mit entwicklungsbiologischen Konsequenzen absuchten (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Zusammen mit Ed B. Lewis wurden sie dafür 1995 mit dem Nobelpreis für Medizin belohnt.

„We have undertaken a systematic search for mutations that affect the segmental pattern depending on the zygotic genome. We describe here mutations at 15 loci which show one of three novel types of pattern alteration, ...“ (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980)

Seitdem ist in der Entwicklung dieses Forschungsgebiets kein Stillstand mehr auszumachen. Während diese Arbeit verfaßt wurde, wurden wichtige Erkenntnisse über die molekularen Entwicklungsmechanismen, die der Achsenausbildung, der Segmentierung, der Zellproliferation und -differenzierung sowie der Entwicklung von Geweben und Organen in Invertebraten und Vertebraten zugrunde liegen, gewonnen.

Den Erkenntnissen ging immer wieder die Etablierung neuartiger Technologien voraus. Sie waren es letztendlich, die das rasante Fortschreiten innerhalb der Entwicklungsbiologie ermöglichten. Mit der vorliegenden Arbeit hoffe ich, diesem Fortschritt ein kleines Stück zugearbeitet zu haben.

Braunschweig im November 1998

Markus Köster

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die Maus im Fokus der Entwicklungsbiologie	1
1.2.	Generierung eines Zelltyp-spezifischen und zeitlich regulierbaren Rekombinationssystems in Mäusen in vivo: Wege zum konditionellen „Knock-Out“	3
1.3.	Die Skelettmuskelentwicklung in Vertebraten	7
1.4.	Ziel der Arbeit /Aufgabenstellung	11
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Bezugsquellen.....	12
2.1.1.	Chemikalien.....	12
2.1.2.	Enzyme	12
2.1.2.1.	Oligonukleotide	12
2.1.4.	Bezugsquellen.....	12
2.1.5.	Radiochemikalien	13
2.2.	Puffer und Stammlösungen	13
2.3.	Bakterienstämme.....	15
2.4.	Klonierungsvektoren.....	15
2.5.	Antibiotika.....	16
2.6.	Verwendete Oligonukleotide	17
2.6.1.	(PCR-vermittelte) Amplifikation von DNA-Fragmenten zwecks Subklonierung.....	17
2.6.2.	Oligonukleotide für eine RT-PCR	19
2.6.3.	Oligonukleotide für eine PCR nach einem „Splicing of Overlap-Extension“ Protokoll (Horton et al., 1994)	19
2.6.4.	Sonstige Primer	20
2.7.	Art und Herkunft der kultivierten Zellen	20
2.8.	Mausstämme	21
2.9.	Molekularbiologische Techniken.....	21
2.9.1.	Standardbedingungen und -methoden der Molekularbiologie	21
2.9.2.	Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren	22
2.9.2.1.	Isolierung genomischer DNA aus tierischen Geweben und kultivierten Zellen	22
2.9.2.2.	Isolierung von cytoplasmatischer RNA aus kultivierten Zellen	23
2.9.3.	Hybridisierung von Oligos zur Generierung von doppelsträngiger DNA	23

2.9.4.	Southern-Transfer von DNA auf Polyamid-Membran	23
2.9.5.	Markierung von Nukleinsäuren durch Random-Priming	24
2.9.6.	Exposition von Autoradiogrammen	24
2.9.7.	Kolonie-Hybridisierung von Bakterienkolonien mit radioaktiven Sonden	24
2.9.8.	PCR	25
2.9.8.1.	Primer-Design	25
2.9.8.2.	Standard-PCR	26
2.9.8.3.	Amplifikation von DNA zwecks Subklonierung	26
2.9.8.4.	RT-PCR	27
2.9.8.5.	Semiquantitative PCR	27
2.9.8.6.	Splicing by Overlap Extension	28
2.9.9.	Klonierung wichtiger Konstrukte	28
2.10.	Proteinbiochemische Methoden	31
2.10.1.	Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen	31
2.10.1.1.	Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen für einen CAT-Assay	31
2.10.1.2.	Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen für einen Kompetitionsassay	31
2.10.2.	Proteinbestimmung	31
2.10.3.	Liganden-Bindungs-Kompitionsassay	32
2.11.	Zellbiologische Methoden	32
2.11.1.	Kultivierung von 10T1/2-Zellen	32
2.11.2.	Passagierung und Kryokonservierung von Zellen	32
2.11.3.	Transfektionen von eukaryontischen Zellen	33
2.11.4.	Fixierung der Zellen und β -Galaktosidase Assay	33
2.11.5.	Nachweis der Alkalischen Phosphatase in eukaryontischen Zellen	33
2.11.6.	β -Galaktosidase Assay zur Bestimmung der qualitativen Transfektionsgüte einer Transfektion	34
2.11.7.	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase [CAT] Assay	34
2.11.8.	Kultur von Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)	35
2.11.8.1.	Medien für die Kultur von ES-Zellen	36
2.11.8.2.	Die Präparation von embryonalen Fibroblasten	37
2.11.8.3.	Elektroporation und Selektion von ES-Zellen	37
2.11.8.4.	Transiente Elektroporation von ES-Zellen mit der Cre Rekombinase	38
2.11.8.5.	Isolierung von ES-Zellklonen und deren Kryokonservierung	38
2.11.9.	Blastozysten-Injektion von ES-Zellen	39
2.11.9.1.	Isolierung von Blastozysten	39
2.11.9.2.	Superovulation von Mäusen	40
2.11.9.3.	Injektion von ES-Zellen	40
2.11.10.	Embryo-Transfer in pseudoträchtige Mäuse	40
2.11.11.	Identifizierung von Chimären	41

3.	Ergebnisse.....	42
3.1.	Generierung und Testung eines transkriptionell und posttranslational regulierbaren eukaryontischen Expressionssystems zur Steuerung der Cre Rekombinase	42
3.1.1.	Strategie.....	42
3.1.2.	Regulation der Aktivität der GAL4 Transaktivator-domäne durch eine Fusion mit dem Ecdyson-Rezeptor: Generierung der Hybridmoleküle.....	43
3.1.2.1.	Test der GAL4-EcR-Hybride im CAT-Assay	44
3.1.2.1.1.	GAL4-E-VP16 ist durch das Ecdyson-Derivat Muristerone A induzierbar: Die Induktion ist in Abwesenheit von USP nachweisbar.	44
3.1.2.1.2.	Einfluß der Muristerone A Konzentration auf die Transaktivierung von GAL4-E-VP16.....	48
3.1.2.1.3.	Transaktivierungen im Serum-armen Medium.....	48
3.1.3.	Generierung und funktioneller Test von Cre-EcR Hybriden in einem heterologen Transkriptionssystem	50
3.1.3.1.	Generierung von Hybridmolekülen aus der Cre Rekombinase und der E-Domäne des Ecdyson-Rezeptor	50
3.1.3.2.	Die Cre-E-Domänen Hybridmoleküle binden ihren Liganden.....	50
3.1.3.3.	Test der Cre-E-Domänen Fusionen in transienten Transfektionen.....	53
3.1.3.4.	Der Einfluß verschiedener Konzentrationen des EcR Heterodimerisierungspartners hRXR β auf die Transaktivierungsrate der Cre-Fusionen.....	57
3.1.4.	Transkriptionelle Kontrolle der Cre Rekombinase mit dem Ecdyson-Rezeptor	59
3.1.4.1.	Das Evan'sche Transaktivator-System: Keine Induktion der Cre Rekombinase	60
3.1.4.2.	SOE-H/SOE-L: Ein modifiziertes Transaktivator-System, das auf der Fusion des Ecdyson-Rezeptors mit dem Co-Rezeptor RXR beruht	62
3.1.4.3.	Die Elemente des Transaktivator-Systems binden ihren Liganden.....	63
3.1.4.4.	Test des bicistronischen und des modifizierten Transaktivator-Systems.....	64
3.1.5.	Die Kombination von transkriptionellen und posttranslationalen Kontrollelementen führt zur verlässlichen Regulation der Cre Aktivität	67
3.1.6.	Eine Alternative zum Liganden Muristerone A: Ponasterone A zeigt höhere Induktionsraten	71
3.1.7.	Das kombinierte Transaktivatorsystem ist in embryonalen Stammzellen wirksam	73
3.2.	Generierung und funktioneller Test eines Myf5 ^{loxP/loxP} Mäusestamms mit Hilfe der ES-Zell-Technologie	75
3.2.1.	Strategie zur Generierung der geflochten ES-Zelllinie/Übersicht.....	77

3.2.2.	Modifizierung des Myf5-Lokus durch homologe Rekombination.....	79
3.2.2.1.	Konstruktion des Zielvektors für die homologe Rekombination	79
3.2.2.2.	Elektroporation des Zielvektors in J1 ES-Zellen und Nachweis der homologen Rekombinations-Ereignisse.....	80
3.2.2.3.	Transiente Expression der Cre Rekombinase in den homolog rekombinierten Myf5 ^{loxP(+/-)HSVtk+} ES-Zellklonen	84
3.2.3.	Generierung eines Myf5 ^{loxP/loxP} Mäusestamms durch Blastozysten-Injektion von ES-Zellen	85
3.2.4.	Test des Myf5 ^{loxP(+/-)} Mäusestamms <i>in vivo</i> durch Kreuzung mit Mx:Cre transgenen Mäusen.....	88
4.	Diskussion.....	91
4.1.	Überblick	91
4.2.	Funktionelle Genanalyse <i>in vivo</i> in Mäusen: der konditionelle „Knock-Out“.....	91
4.3.	Der Ecdyson-Rezeptor: Ein Mitglied der nukleären Rezeptor-Superfamilie.....	95
4.4.	Der Ecdyson-Rezeptor: Ein Werkzeug der Molekular- biologie in Säugetieren?	99
4.4.1.	Systeme mit posttranslationalen Kontrollelementen.....	99
4.4.2.	Systeme mit transkriptionellen Kontrollelementen	103
4.4.3.	Ein System, das transkriptionelle und posttranslationale Kontroll- elemente verbindet, eignet sich zu Regulation der Cre Rekombinase	106
4.5.	Die Verwendung des Cre/loxP Systems zur Analyse des myogenen Faktors Myf5	108
4.5.1.	Myogenese und Muskelregeneration <i>in vivo</i>	108
4.5.2.	Die funktionelle Analyse von Myf5.....	110
4.6.	Ausblick.....	113
5.	Literaturverzeichnis.....	115
6.	Zusammenfassung (deutsch)	135
7.	Summary (English)	136

Abkürzungen

A:	Adenin
Abb.:	Abbildung
ATCC:	American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
bHLH:	Helix-Loop-Helix, basisch
bp:	Basenpaare
BSA:	bovine serum albumine
C:	Cytosin
CAT:	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
cDNA:	copy Desoxyribonukleinsäure
Cre:	center of recombination (of phage P1)
d:	Tag
DMSO:	Dimethyl-Sulfoxid
EcR:	Ecdyson-Rezeptor
ER:	Östrogen-Rezeptor
ES:	embryonale Stammzelle
f.c.:	final concentration (Endkonzentration)
FCS:	fötales Kälberserum
G:	Guanin
h:	Stunde
HSV-tk:	Herpes Simplex Virus Thymidin-Kinase
kb:	Kilobasen-Paare
LacZ:	β -Galaktosidase
loxP:	locus of crossing over (of phage P1)
mpc:	muscle precursor cell
mRNA:	Messenger Ribonukleinsäure
myf:	myogener Faktor
neo:	Neomycin
Pax:	paired box
p.c.:	post coitum
PDGF:	Platelet Derived Growth Factor
PGK:	Phosphoglukokinase
RT-PCR:	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
T:	Thymin
Tab.:	Tabelle
wt:	Wildtyp
X-Gal:	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid

1. Einleitung

1.1. Die Maus im Fokus der Entwicklungsbiologie

Die Maus *Mus musculus* gehört zu denjenigen Tierarten, die sich im besonderen Interesse der molekularen Entwicklungsbiologie befinden. Die in der Maus und in wenigen anderen Tierarten gewonnenen Erkenntnisse über spezifische Prozesse der Entwicklung sind Grundlage diverser Untersuchungen und besitzen für die übrigen Vertreter der Säugetiere inklusive des Menschen einen modellhaften Charakter.

So wichtig wie *Drosophila melanogaster* für die Entdeckung wesentlicher Prinzipien der Entwicklungsbiologie ist, so wichtig ist *Mus musculus* für das Verständnis entwicklungsbiologischer Mechanismen der Vertebraten. Die Maus ist das Modelltier für die Entwicklung der höheren Vertebraten schlechthin. Kein anderes Säugetier, mit Ausnahme des Menschen, ist genetisch ähnlich gut kartiert wie die Maus. Für die funktionelle Genanalyse der Maus gibt es heute auf der Ebene der Säugetiere noch keine befriedigende Alternative. Sie stellt ein wichtiges Modellsystem zur Erforschung menschlicher Erbkrankheiten dar. Die Kombination von embryologischen und molekulargenetischen Methoden hat sich in der Maus als sehr erfolgreich erwiesen.

Die Embryologie der Maus ist ein altes Forschungsgebiet, zumindestens aus der Sicht der modernen Entwicklungsbiologie (für einen historischen Überblick siehe Hogan et al., 1994). Sie wurde um die Jahrhundertwende herum von W.E. Castle und J.B.S. Haldane begründet. Die wichtigsten Labor-Mäusestämme wie z.B. der Stamm C57/Bl6 wurden um die gleiche Zeit herum etabliert. Die Funktion der „Urfarm“ für die Aufrechterhaltung spezifischer Inzucht-Mäusestämme bekam in den 20er Jahren das Jackson Memorial Laboratory in Bar Harbor, Maine, USA. In den 50er und 60er Jahren wurde mit Hilfe von klassischen Zuchtprogrammen eine Reihe von Mausmutanten generiert und untersucht. Außerdem starteten Untersuchungen zur Kartierung der 20 Chromosomen (des haploiden C-Satzes) der Maus. Die molekulare Natur dieser Mutanten wurde freilich oft erst in den 90er Jahren dieses Jahrhunderts aufgeklärt.

Den Durchbruch erhielt die „Mäuseforschung“ mit den Methoden der reversen Genetik. Während in der ersten Phase das Mäusegenom mit unspezifisch wirksamen Mutagentien verändert wurde, etablierte sich in den 80er Jahren und in diesem Jahrzehnt das sogenannte „Gene Targeting“ durch homologe Rekombination (Joyner et al., 1993). Die Methode beruhte auf der Beobachtung, daß sich ein genomisches DNA-Fragment, nachdem es in eine Säugetierzelle eingeführt worden war, an die homologen, endogenen Sequenzen anlagern und rekombinieren konnte. Der erste experimentelle Beweis für die Durchführbarkeit eines „Gene Targetings“ wurde anhand eines selektierbaren Markers in einer Fibroblastenzelllinie erbracht (Lin et al.,

1985). Anschließend konnte es von Smithies et al. (Smithies et al., 1985) für das β -Globin Gen in Erythroleukämie Zellen nachgewiesen werden. Im allgemeinen war die Zielfrequenz in Säugetierzellen aber sehr gering. Das Verhältnis von gezielter zu zufälliger Integration entschied darüber, wie leicht gezielt mutagenisierte Klone erhalten werden konnten.

Die Verwendung von Selektionsmarkern half, die Frequenz einer homologen Rekombination zu erhöhen. Diese waren entweder in den homologen Bereich eingebettet (z.B. das Neomycin-Resistenz-Gen) und wurden für eine positive Selektion eingesetzt oder befanden sich außerhalb des homologen Bereichs (z.B. das Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase Gen) und wurden dann für eine negative Selektion eingesetzt (Thomas und Capecchi, 1987; Capecchi, 1989). Mit der homologen Rekombination konnten gezielt Gene ausgeschaltet werden, indem man in ihren codierenden Bereich die Sequenzen für eine Selektionskassette, die aus einem Selektionsmarker und seinem Promotor bestand, einfügte. Aufgrund des Phänotyps der Zelllinie oder des Organismus konnte anschließend indirekt auf die Wildtyp Funktion des Gens *in vivo* geschlossen werden.

„High on the wish-list of anyone studying mammalian cells is the ability to mutate any cloned gene whose function *in vivo* is not yet known. [...] Mansour, Thomas, and Capecchi help to bring realization of the dream a step nearer by describing an ingenious and general method for greatly increasing the efficiency of selection of correctly targeted ES cells. [...] Gene targeting in ES cells thus offers exiting possibilities for mammalian developmental genetics.“ (Hogan und Lyons, 1988)

Eine zweite wichtige Entwicklung auf dem Gebiet der „Mäusegenetik“ war die Isolierung von pluripotenten Embryonalen Stammzelllinien (ES Zellen) aus der inneren Zellmasse (ICM) von Mausblastozysten (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Die wichtigste Eigenschaft dieser ES-Zelllinien war ihre Pluripotenz. So konnten sie sich, nachdem man sie in eine Mausblastozyste injiziert hatte, an der Ausbildung aller Gewebe und Zelltypen einschließlich der Keimbahn des Wirtsembryos beteiligen. Damit ließen sich ES-Zellen, die durch homologe Rekombination mutiert waren, in den Mäuseembryo zurück transferieren (Gossler et al., 1986; Mansour et al., 1988; Thomas und Capecchi, 1987). Die daraus entstandenen chimären Mäuse stellten den Ausgangspunkt zur Zucht homozygot mutierter Mäusestämme dar, denen ein spezifisches Genprodukt nicht zur Verfügung stand. Aus dem daraus resultierenden Phänotyp ließ sich Aufschluß über die ursprüngliche Genfunktion erzielen. Das „*Gene Targeting*“ in ES-Zellen mit anschließendem Transfer und Analyse in der Maus wurde als „Knock-Out“ bekannt. Zu den ersten so analysierten Gene gehörten β_2 -Microglobulin (Zijlstra et al., 1990), *engrailed-2* (en-2; Joyner, 1989; Joyner, 1991); FGF-3 (int-2; Mansour et al., 1988; Mansour et al., 1993), und Wnt-1 (int-1; McMahon et al., 1990; Thomas et al., 1990).

Heutzutage gehört diese anspruchsvolle Methode zur einer der Standardtechniken der Molekularbiologie. Die große Anzahl der bisher publizierten „Knock-Outs“ führte zu der Einrich-

tung verschiedener Datenbanken, wo Informationen zu einzelnen „Knock-Outs“ abgefragt werden können. Beispiele sind (A) die Datenbank der Johns Hopkin School of Medicine (TBASE) und (B) die BioMedNet Mouse Knock Out and Mutation Database (mkmd):

(A) <http://www.bis.med.jhmi.edu/Dan/tbase>

(B) <http://www.biomednet.com/db/mkmd>

Die Protokolle für die „Knock-Out“ Technologie wurden seit ihrer erstmaligen Anwendung je nach Fragestellung modifiziert. So zielt z.B. die davon abgeleitete „Knock-In“ Technik auf den Austausch eines Gens gegen ein anderes, um Fragen der Redundanz oder der Epistase zu klären (Hanks et al., 1995). Ein weitere Anwendung dieser Methode dient der Markierung derjenigen Zellen mit dem Gen für die β -Galaktosidase, die das zu untersuchende Gen ursprünglich exprimiert hätten.

Eine der großen Herausforderungen innerhalb der „Knock-Out“ Technologie stellt die Etablierung von Protokollen für einen konditionellen „Knock-Out“ dar. Die ursprünglichen Anwendungen resultierten nämlich grundsätzlich in eine konstitutive Ausschaltung des zu untersuchenden Gens. Dieser Umstand wurde immer dann zum Problem, wenn das jeweilige Genprodukt so wichtig für die Entwicklung der Maus war, daß seine Ausschaltung letal war. Dann konnten Fragestellungen, die eine Funktion des jeweiligen Gens in späteren Entwicklungsstadien betrafen, nicht mehr beantwortet werden. Das Ziel ist es deshalb, ein Zelltyp-spezifisches und zeitlich regulierbares System zu etablieren, das eine konditionelle Ausschaltung eines Gens in einem bestimmten Gewebe oder Zelltyp zu einem bestimmten Zeitpunkt ermöglicht.

1.2. Generierung eines Zelltyp-spezifischen und zeitlich regulierbaren Rekombinationssystem in Mäusen *in vivo*: Wege zum konditionellen „Knock-Out“

Das Hauptproblem der Generierung eines konditionellen „Knock-Outs“ in Mäusen ist der Umstand, daß die Genausschaltung in einem komplexen Organismus stattfinden soll. Die Entwicklung der Säugetiere findet *in utero* statt, ein Ort, der für den Experimentator nur sehr schwer zugänglich ist.

Ein Ausweg aus diesem Dilemma wurde zum ersten Male von K. Rajewskys Arbeitsgruppe beschrieben (Gu et al., 1993). Sie verlegten den kritischen Zeitpunkt der Rekombination, der zur Deletion des jeweiligen Gens führt, von den ES-Zellen in den sich entwickelnden Organismus. Dazu bedienten sie sich des sequenzspezifischen Cre/loxP Rekombinationssystems aus dem Bakteriophagen P1 (Austin et al., 1981). Dieses Enzym gehört zu einer lose zusammengehörenden Familie sequenzspezifischer Rekombinasen (Argos et al., 1986). Weitere

Vertreterinnen dieser Gruppe sind z.B. die Flp Rekombinase aus der Hefe *S. cerevisiae* (Broach et al., 1982) oder die R Rekombinase aus der Hefe *Zygosaccaromyces rouxii* (Araki et al., 1985). Die Cre Rekombinase stellt die am besten untersuchte Vertreterin ihrer Familie

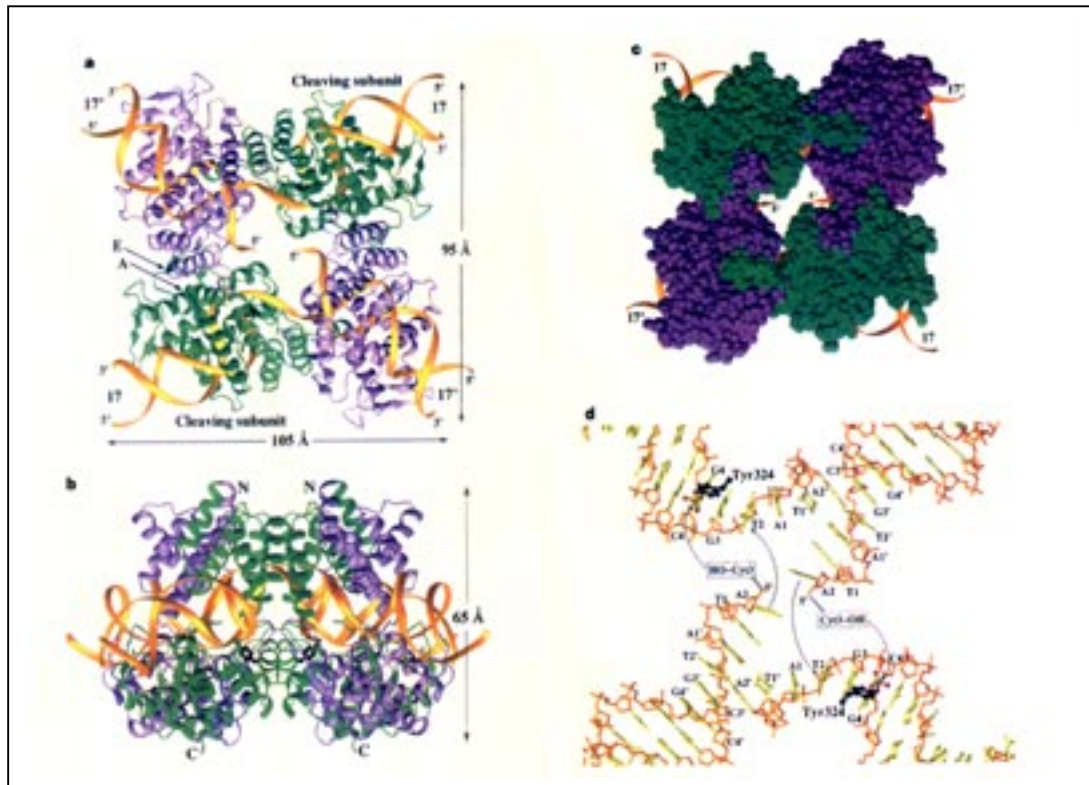


Abb. 1:

Modell der Cre-loxP Synapse. (A): Ansicht auf die aminoterminalen Seite des Cre-Tetramers. (B): Seitenansicht. (C): 3-D-Modell des Tetramers, die Ansicht erfolgt diesmal von der carboxyterminalen Seite des Komplexes. In (A-C) ist die DNA jeweils als gebänderte Helix dargestellt. (D): Struktur des DNA-Substrats aus der gleichen Perspektive wie in (C), jedoch ohne Tetramer. Die Positionen, an denen die DNA geschnitten wird, sind hervorgehoben. Die Cre Rekombinase, die die loxP Sequenz schneidet, ist grün hervorgehoben, die andere jeweils violett (entnommen aus Guo et al., 1997).

dar. Vier Cre Rekombinasen bilden während des Rekombinationsprozesses eine synaptische Struktur mit zwei ihrer spezifischen, 34 bp langen loxP (*locus of crossing over [x] of P1 recombinase*) Erkennungssequenzen (Guo et al., 1997; Abb.1). Dabei kommt es zu einer homologen Rekombination zwischen den loxP Sequenzen, die in eine Deletion (bei einer direkten Wiederholung der loxP Sequenzen) oder in eine Inversion (bei einer inversen Wiederholung der loxP Sequenzen) des dazwischen liegenden DNA-Abschnitts resultieren (Austin et al., 1981). Das Cre/loxP System ist auch außerhalb seiner ursprünglichen Umgebung in der Hefe *S. cerevisiae* (Sauer, 1987), in Säugetier-Zelllinien (Sauer und Henderson, 1989) und in transgenen Mäusen (Orban et al., 1992; Araki et al., 1995) aktiv. Dabei verhält sich das 38 kD große Enzym sequenzspezifisch und rekombiniert lediglich zwischen seinen loxP Erkennungssequenzen.

Für die „Gene Targeting“ Experimente wird zunächst das zu untersuchende Gen in ES-Zellen von loxP Sequenzen mit den Methoden für die homologe Rekombination flankiert („gefloxt“). Als Zwischenprodukt nach dem homologen Rekombinationsereignis erhält man einen „geflochten“ Genloкус, in dem zusätzlich noch eine Selektionskassette integriert ist. Um eine ungestörte Expression des zu untersuchenden Gens zu gewährleisten, muß die Selektionskassette wieder entfernt werden. Dazu stehen sogenannte „*Hit and Run*“ Protokolle zur Verfügung (Valancius et al., 1991; Askew et al., 1993; Wu et al., 1994). Eine elegante Methode beruht auf der Verwendung einer „geflochten“ Selektionskassette. Sie resultiert in die Integration von insgesamt drei loxP Sequenzen nach dem homologen Rekombinationsereignis und ermöglicht die Entfernung der Selektionskassette durch die transiente Expression der Cre Rekombinase in den ES-Zellen (Gu et al., 1994). Ein Screen führt zu der Isolierung von ES-Zellen, die lediglich ein „gefloxtes“ Gen enthalten. Aufgrund der Wahl der Integrationsorte und der geringen Größe der loxP Sequenzen bleibt die Expression des Gens ungestört, so daß die daraus entstehenden transgenen „geflochten“ Tiere phenotypisch unauffällig sind. In einem zweiten Schritt werden die „geflochten“ Mäusestämme mit Mäusen gekreuzt, die die Cre Rekombinase transgen exprimieren (Gu et al., 1994). Die Nachkommen dieser Kreuzung inaktivieren das zu untersuchende Gen in Abhängigkeit von der gewebespezifischen Expression der Cre Rekombinase.

„Clever new techniques allow researchers to achieve the long-sought goal of inactivating mouse genes specifically in selected cell types“ (Barinaga, 1994).

In der Originalarbeit wurden T-Zell spezifische Promotoren für die Expression der Cre Rekombinase verwendet, theoretisch ist aber jedes aktive Promotor- oder Enhancer-Konstrukt verwendbar. Ein Jahr später wurde von der gleichen Arbeitsgruppe die erste Arbeit mit einem zeitlich regulierbaren Promotorsystem veröffentlicht (Kühn et al., 1995). Dabei wurde die Cre Rekombinase mit Hilfe eines durch Interferone induzierbaren Promotor aktiviert.

Ein weiteres Regulatorsystem beruht auf dem Tetrazyklin-Repressor System aus *E.coli* (Gossen und Bujard, 1992). Die Fusion des Repressors mit dem VP16 Gen aus dem Herpes Simplex Virus ermöglicht seinen Einsatz in Säugetier-Zellen. Die Expression resultiert in eine Tetrazyklin abhängige Repression von Zielgenen, deren Promotor die 19 bp lange *tetO* Erkennungssequenz besitzt (tTA System). Später wurde eine Mutante generiert, die als transkriptioneller Aktivator in Abhängigkeit eines Induktors wirkt (rtTA; Gossen et al., 1995). Der Nachweis für die physiologische Wirksamkeit in transgenen Mäusen wurde für beide Varianten erbracht (Kistner et al., 1996; St-Onge et al., 1996).

Allen Arbeiten war gemeinsam, daß transkriptionelle Mechanismen zur Regulation der Cre Rekombinase angewendet wurden. Es gab aber auch Ansätze, die auf eine posttranslationale Kontrolle der Cre Rekombinase zielten. Diese beruhten im allgemeinen auf einer Fusion der

Cre Rekombinase mit einem Hormonrezeptor. Das Prinzip wurde für Säugetierzellen mit dem Ecdyson-Rezeptor (Christopherson et al., 1992) und mit dem Östrogen-Rezeptor (Brasermann et al., 1993) entwickelt.

Beide gehören zu der Klasse der nukleären Steroidrezeptoren (Übersichtsartikel: Evans, 1988; Mangelsdorf und Evans, 1995) und sind an der Übertragung von exogenen Signalen in den Zellkern beteiligt. Vor ihrer Aktivierung sind die Rezeptoren cytoplasmatisch lokalisiert. Nach ihrer Aktivierung, die durch die Bindung eines spezifischen Steroidliganden induziert wird, homodimerisieren die Rezeptoren miteinander und transferieren in den Nukleus, wo sie als Transaktivatoren die Transkription Hormon-induzierbarer Gene ermöglichen. Der Ecdyson-Rezeptor bildet in diesem Zusammenhang eine interessante Ausnahme, weil er als einziger bekannter Steroid-Rezeptor nach seiner Aktivierung ein Heterodimer formiert. Der in seiner natürlichen Umgebung vorkommende Heterodimerisierungsfaktor heißt Ultraspiracle (USP; Yao et al., 1992; 1993; Thomas et al., 1993). Er gehört zu der Klasse der Orphanrezeptoren und ist das *Drosophila* RXR-Homolog. Der Ecdyson-Rezeptor kann *in vitro* daher auch Heterodimere mit einem der Rezeptoren RXR α - γ formen (Thomas et al., 1993; Yao et al., 1993). Die Interaktion ist in jedem Falle für die Ligandenbindung sehr wichtig, da der Ecdyson-Rezeptor als Monomer oder Homodimer nur schlecht Ecdyson bindet (Yao et al., 1993).

Die Mitglieder der nukleären Rezeptoren sind aus kleinen hochkonservierten Modulen oder Domänen, denen jeweils eine spezifische Aufgabe zugeordnet werden kann, zusammengesetzt. Diese Entdeckung führte in die Aufteilung der Rezeptoren in die Domänen A-F. Die A-Domäne und ein Teil der E-Domäne enthalten Transaktivatorfunktionen (Danielian et al., 1992), die C-Domäne ist für die DNA-Bindung zuständig, weshalb sie auch als DNA-Bindungsdomäne (DBD) bezeichnet wird (Evans et al., 1988). Die D-Domäne bildet ein Scharnier zwischen der DBD und der E-Domäne, die für die Ligandenbindung und weitere Protein-Protein-Interaktionen notwendig ist (Krust et al., 1986; Laudet et al., 1992). Die E-Domäne wird daher auch als Hormon-Bindungsdomäne (HBD) bezeichnet. Interessanterweise wirken die einzelnen Domänen autonom voneinander. In Domänen austauschexperimenten konnten chimäre nukleäre Rezeptoren hergestellt werden, die die Eigenschaften der einzelnen Domänen neu kombinierten (Green und Chambon, 1987). Diese Fähigkeit machte man sich zunutze, um die Aktivität heterologer Moleküle zu regulieren. Durch die Fusion mit der HBD der Steroidrezeptoren konnte die Aktivität diverser Moleküle von Ligandgaben abhängig gemacht werden (Picard, 1994). In den meisten Studien wurden bisher modifizierte Östrogen-Rezeptoren verwendet. Diese ließen sich nicht von dem endogenen Östrogen der Maus, sondern nur noch von einem synthetischen Östrogenderivat, 4-OH-Tamoxifen, induzieren.

Da die bisher verwendeten Maßnahmen zur Regulation der Cre Rekombinase durch eine hohe Basalaktivität des Steuerungssystems gekennzeichnet sind, stellt die Etablierung eines Zell-

typ-spezifischen und zeitlich-regulierbaren Cre/loxP Rekombinationssystemen ein ungelöstes Problem dar. Daher wurde ein System geschaffen, das transkriptionelle und posttranslationelle Kontrollelemente vereinigte, um eine Regulation der Cre Rekombinase zu gewährleisten. Dabei sollte die Induktion der Cre Rekombinase aber nicht von der bloßen Aktivität des Promotors abhängig, sondern frei wählbar sein. Ausgangspunkt für die transkriptionelle Kontrolle war ein Ecdyson abhängiges Transaktivatorsystem (No et al., 1996). Dieses beruhte auf der Expression eines Fusionsproteins aus dem Ecdyson-Rezeptor aus *D. melanogaster* (Koelle et al., 1991) mit dem VP16 Gen aus dem Herpes Simplex Virus. In den gleichen Zellen wurde das Säugetier-Homolog des Ecdyson-Corezeptors Ultraspiracle (Yao et al., 1992), der humane Retinoid-X-Rezeptor α (hRXR α ; Mangelsdorf et al., 1992), exprimiert. Die DNA-Bindungsstellen des Ecdyson-Reporters waren mutiert, so daß keine Wechselwirkungen mit endogenen Steroidrezeptoren auftreten konnten (No et al., 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Modifikationen durchgeführt, die unabdingbar für eine Regulation der Cre Rekombinase waren.

Durch die Herstellung von Fusionen der Cre Rekombinase mit einem Teil der Hormonbindungsdomäne des Ecdyson-Rezeptors war auch das posttranslationale Regulatorsystem von Ecdyson Gaben abhängig. Die Aktivität der Cre Rekombinase konnte so von Ligandgaben für den Ecdyson-Rezeptor abhängig gemacht werden.

Die Verwendung der einzelnen Komponenten dieses Regulationssystems erwies sich zunächst als nicht ausreichend für die Aktivitätskontrolle der Cre Rekombinase. Erst die Kombination der transkriptionellen und posttranslationalen Kontrollelemente ermöglichte eine verlässliche Kontrolle der Cre Rekombinasen Aktivität. Die Regulatoren konnten dabei durch die exogene Zugabe des Ecdyson-Rezeptor Liganden aktiviert werden.

1.3. Die Skelettmuskelentwicklung in Vertebraten

Im Rahmen meiner Promotion wurden des weiteren die Voraussetzungen für die konditionelle Ausschaltung des myogenen Faktors Myf5 durch die Züchtung und funktionellen Testung eines homozygoten Myf5^{loxP/loxP} Mäusestamms geschaffen. Daher gibt dieser Abschnitt eine Einführung in die Myogenese der Vertebraten.

Die Skelettmuskelentwicklung (*Myogenese*) gehört zu den am besten untersuchten Entwicklungsvorgängen in der Maus (für aktuelle Übersichtsartikel siehe z.B.: Currie et al., 1998; Borycki et al., 1997; Buckingham et al., 1997; Cossu et al., 1996; Arnold et al., 1996). Dennoch sind wichtige Details weiterhin ungeklärt.

In der Maus startet die Myogenese am Tag 8,5 der Embryogenese mit der Expression des muskelspezifischen Transkriptionsfaktors Myf5 (Braun et al., 1989a; Sasson, 1993). Myf5

wird zunächst in dem dorso-medialen Abschnitt der rostralen epithelialen Somiten und später des Dermomyotoms exprimiert. Mit der Reifung der mehr caudalen Somiten breitet sich das Expressionsmuster in caudaler Richtung aus. (Bober et al., 1991; Ott et al., 1991; Sassoon et al., 1989; Sassoon, 1993; Wright et al., 1989). In einem mehr lateralen Kompartiment des Dermomyotoms wird ca. 2 Tage später ein Verwandter von Myf5, MyoD (Davis et al., 1987), exprimiert. Umstritten ist dabei, ob die beiden myogenen Faktoren redundant wirken oder jeweils andere Muskelzelllinien begründen (Stockdale, 1992; Ordahl und Le Dourain, 1992; Braun und Arnold, 1996). Nach einer Hypothese scheint Myf5 eher für epaxiale Bereiche der Skelettmuskulatur verantwortlich zu sein, während MyoD bevorzugt in Vorläuferzellen der hypaxialen Muskulatur exprimiert wird. Allerdings herrscht zu diesem Zeitpunkt der Myogenese noch eine gewisse Flexibilität vor, was für eine redundante Funktion sprechen würde.

Die Somiten sind die Ausgangsbereiche für die Muskulatur des Rumpfes und der Extremitäten. Im Kopfbereich unterliegt der Prozeß der Myogenese aufgrund des Fehlens von Somiten dagegen anderen Mechanismen. Dennoch wird auch hier die Myogenese durch die Expression von Myf5 eingeleitet (Hacker und Guthrie, 1998). Die Vorläufer für die Extremitätenmuskulatur entstammen lateral gelegenen Bereichen der Somiten, die an die Extremitätenknospe angrenzen. Undifferenzierte Vorläuferzellen lösen sich von dem lateralen Somitenbereich ab und wandern in die sich entwickelnde Vorder- bzw. Hinterbeinextremität. Die Induktion der Wanderung wird durch die Interaktion des Tyrosinkinase Rezeptors *c-met* mit seinem spezifischen Liganden HGF ausgelöst. Die wandernden Zellen exprimieren *c-met* (Bladt et al., 1995), die Zellen der Zielregion den Liganden HGF (Naldini et al., 1991; Heymann et al., 1996). Erst am Zielort in den Extremitäten wird zunächst auch wieder Myf5 am Tag 10,5 der Embryogenese, gefolgt von MyoD am Tag 11,5 exprimiert (Sassoon, 1993).

Die Myf5 und MyoD exprimierenden Zellen besitzen normale Zellteilungsfähigkeit, sind aber unweigerlich determiniert, sich in Muskelzellen auszudifferenzieren. Sie werden daher als Myoblasten bezeichnet. Die ausdifferenzierenden Zellen exprimieren muskelspezifische Markergene und verschmelzen zu mehrkernigen Synzytien. Diese späteren Prozesse der Myogenese werden *in vivo* von weiteren Vertretern der myogenen Familie gesteuert: von Myogenin (Wright et al., 1989; Edmondson et al., 1989) und von MRF4/Herculin/Myf6 (Rhodes et al., 1989; Miner et al., 1990; Braun et al., 1990a). Zusammen mit Myf5 und MyoD gehören sie zu einer Familie von muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren. Sie werden gemeinhin als myogene Faktoren bezeichnet. Myogenin leitet die Differenzierung der Myoblasten ein. Dabei verlieren diese ihre Zellteilungsfähigkeit und verschmelzen zu einem mehrkernigen Synzytium, dem Myotom. Dieses exprimiert die typischen muskelspezifischen Gene wie Aktin und Myosin. Während die Expression von Myf5 transient ist und sich nur bis zum Tag 12 bzw. 13,5 (Rumpf versus Extremitäten) der Embryogenese der Maus erstreckt, werden Myogenin und MyoD bis in die Adultphase der Maus exprimiert. Myf6 wiederum hat ein bipha-

sisches Expressionsprofil. Die frühe Phase setzt am Tag 9,5 der Embryogenese ein und erstreckt sich bis Tag 12,5. Die späte Phase setzt nach der Geburt ein und erstreckt sich ebenfalls in die Adultphase der Maus (Bober et al., 1991).

Die myogenen Faktoren teilen nicht nur auf der Expressionsebene, sondern auch auf der strukturellen Ebene große Ähnlichkeiten. So gehören die vier zu der Klasse der bHLH-Transkriptionsfaktoren (Murre et al., 1989a/b; Ma et al., 1994) und besitzen konservierte Phosphorylierungsstellen (Braun et al., 1990b; Tapscott et al., 1988; Li et al., 1992). Alle vier heterodimerisieren mit ubiquitären bHLH-Molekülen der E2A Genfamilie (Braun et al., 1990b; Murre et al., 1989). Ihre Überexpression führt zu einer myogenen Konvertierung von diversen Zelllinien, weshalb sie auch als „Mastergene der Muskeldifferenzierung“ bzw. „Knotenpunkt der Myogenese“ bezeichnet wurden (Weintraub et al., 1990; 1993).

Interessant ist auch die Art und Weise ihrer Entdeckung. MyoD wurde als erster myogener Transkriptionsfaktor in einem differentiellen Screen entdeckt (Lassar et al., 1986; Davis et al., 1987). Zugrunde liegt dem die Entdeckung, daß eine bestimmte Fibroblasten-Zelllinie, 10T1/2 (Reznikoff et al., 1973), nach Behandlung mit einem Demethylierungsreagenz spontan in Muskelzellen differenziert (Taylor und Jones, 1979). In Homologie-Screens wurden dann die übrigen myogenen Faktoren in der Maus und im Menschen entdeckt. Erst später konnte auch ein *Drosophila* Homolog entdeckt werden (Michelson et al., 1990), was auf die große Bedeutung dieser Moleküle innerhalb der Evolution hinweist.

Im Rahmen von „Knock-Out“ Studien wurden alle vier Faktoren auf der funktionellen Ebene in der Maus untersucht. Dabei wurde ihre z.T. überlappende Funktion entdeckt. So waren MyoD^{-/-} Mäuse vital und zeigten nur einen sehr subtilen Muskelphänotyp (Rudnicki et al., 1992; Megeney et al., 1996). Myf5^{-/-} Mäuse hingegen waren perinatal letal, wiesen aber bei der Geburt keinen offensichtlichen Muskelphänotyp auf (Braun et al., 1992). Die Analyse der Mäuse zeigte aber, daß die Initiierung der Myogenese zeitlich verzögert war und erst mit der Expression von MyoD einsetzte (Braun et al., 1994). Dafür waren die Rippen dieser Mäuse mißgebildet, so daß der Brustkorb nicht ausgebildet werden konnte (Abb. 2). Dieses ist die Ursache für die perinatale Letalität. Erst der „Doppel-Knock Out“ beider Gene zeigte einen drastischen Muskelphänotyp (Rudnicki et al., 1993). Die offensichtlich überlappende Funktion von Myf5 und MyoD ist ein klassisches Beispiel für Redundanz. Die Ausschaltung von Myogenin bestätigte seine Rolle als Differenzierungsfaktor (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993). „Doppel-Knock Out“ Studien, die die Phänotypen der „Einzel Knock-Outs“ nicht verstärkten, belegten, daß Myogenin hierarchisch niedriger angesiedelt war als Myf5 und MyoD und parallel zu diesen agierte (Rawls et al., 1995). Der „Knock-Out“ von Myf6 erwies sich in der Analyse als sehr kompliziert, und deckte vor allem das subtile regulative Netzwerk zur Steuerung von Myf5 auf (Olson et al., 1996). Das exakte Verhältnis der einzelnen Faktoren zueinander und ihre Regulation durch Gene höherer Hierarchie ist bis heute größtenteils

**Abb. 2:**

Skelettpräparationen von neugeborenen Wildtyp und homozygoten $Myf5^{-/-}$ -Mäusen. Die Präparation macht die Skelett- und Knorpelstruktur der Mäuse sichtbar. Das Tier auf der linken Seite der Abbildung repräsentiert eine Wildtyp-Maus, das auf der rechten Seite eine homozygote $Myf5^{-/-}$ Maus. $Myf5^{-/-}$ Mäuse weisen eine extreme Verringerung der distalen Rippenlänge auf. Die Tiere sterben daher direkt nach der Geburt (Abb. aus Braun et al., 1992).

ungeklärt. Weitere „Doppel-Knock Out“ Studien lieferten Hinweise zur Epistase der myogenen Faktoren. Doppelt Homozygote Splotch ($Pax3^{-/-}$)/ $Myf5^{-/-}$ Mäuse wiesen keine Expression von MyoD im Körperstambereich auf, was MyoD als direktes Zielgen von Myf5 und Pax3 auswies (Tajbakhsh et al, 1997).

Über die Funktion von Myf5 z.B. innerhalb der Prozesse der Muskelregeneration in der adulten Maus *in vivo* konnten keine Aussagen gemacht werden, da der „Knock-Out“ letal war. Daher war die Züchtung eines konditionell inaktiven Myf5 Stammes von großem Interesse. In diesem soll Myf5 nach der Vollendung seiner Aufgabe innerhalb der Rippenbildungsprosse konditionell ausgeschaltet werden.

1.4. Ziel der Arbeit /Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war die Aufstellung von Bedingungen für die Etablierung eines Zelltyp-spezifischen und zeitlich regulierbaren Rekombinationssystems in der Maus. Dieses Rekombinationssystem sollte den Ausgangspunkt für den konditionellen „Knock-Out“ eines beliebigen Gens darstellen. Im Mittelpunkt meines Interesses stand dabei der myogene Faktor Myf5.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Studien zur Generierung des induzierbaren Rekombinationssystems durchgeführt. Dabei wurde die sequenzspezifische Cre Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 verwendet. Durch eine neuartige Kombination von transkriptionellen und post-translationalen Regulationselementen wurde die Aktivität der Rekombinase kontrolliert. Beide Regulationselemente leiteten sich von dem Ecdyson-Rezeptor aus *Drosophila melanogaster* ab. So wurde die Cre Rekombinase Transkription von Ecdyson-Rezeptor spezifischen DNA-Bindungselementen und ihre enzymatische Aktivität durch die Fusion mit der Ligandenbindungsdomäne aus demselben Rezeptor kontrolliert. Die Kombination ermöglichte eine verlässliche Reduktion der Basalaktivität und eine signifikante Induktion nach Zugabe des Liganden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein modifiziertes Myf5 Allel mittels homologer Rekombination geschaffen. Nach Abschluß der Rekombinationsschritte flankierten zwei loxP Sequenzen, die Erkennungssequenzen für die Cre Rekombinase, das Myf5 Gen. Dabei war die oberhalb des Myf5 Gens liegende loxP Sequenz in sicherer Entfernung vom Basalpromotor und die andere loxP Sequenz in das Intron 1 von Myf5 inseriert. Dieses gewährleistete letztendlich eine ungestörte Expression von Myf5. Mit dem entsprechenden Zielvektor wurden embryonale Stammzellen der Maus elektroporiert. Die korrekt rekombinierten ES-Zellen wurden in Maus-Blastozysten injiziert. Die daraus entstandenen chimären Mäusen wurden zur Zucht eines homozyoten Myf5^{loxP/loxP} Stamms verwendet.

Anschließend wurde die Funktionalität der loxP Sequenzen *in vivo* mittels Kreuzung von Myf5^{loxP/+} Mäusen mit transgenen Mx:Cre Mäusen, die die Cre Rekombinase von einem Interferon induzierbaren Promotor aus exprimierten, nachgewiesen.

2. Material und Methoden

2.1. Bezugsquellen

2.1.1. Chemikalien

In der Regel p.a. Substanzen folgender Firmen: Amersham Buchler GmbH (Braunschweig), Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), Invitrogen Ltd. (Leek/NL), Merck AG (Darmstadt), New England Biolabs GmbH (Schwalbach), Oncor/Applicene (Heidelberg), Pharmacia Fine Chemicals AG (Freiburg), Promega Deutschland GmbH (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Sigma Chemie (Deisenhofen), Stratagene GmbH (Heidelberg)

2.1.2. Enzyme

Sämtliche Enzyme wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von New England Biolabs bezogen.

2.1.2.1. Oligonukleotide

Als Bezugsquellen für Oligonukleotide dienten: GBF – Gesellschaft für Biotechnologische Forschung GmbH (Braunschweig), Eurogentec (Köln), Pharmacia (Heidelberg)

2.1.4. Bezugsquellen

Gebrauchswaren wurden in der Regel von der Firma Wilke & Witzel (Hamburg), die die Produkte der meisten Firmen vertreibt, bezogen.

Blottingpapier GB-003	Schleicher & Schüll, Dassel
DEAE-Membran NA45	Schleicher & Schüll, Dassel
Einmalfilter Minisart NML (Porengröße 0,20 und 0,45 µm)	Sartorius, Göttingen
Filterpapier 0858	Schleicher & Schüll, Dassel
Nitrozellulosefilter BA 85	Schleicher & Schüll, Dassel
Objektträger und Deckgläser	Schütt, Göttingen
Pall-Membran	Pall Filtrationstechnik, Dreieich
Plastikwaren	Falcon GmbH, Düsseldorf
	Greiner GmbH, Frickenhausen
	Life Technologies GmbH, Eggenhausen

Polyamidmembran Nytran Plus	Nunc GmbH, Wiesbaden
Reaktionsgefäße	Schleicher & Schüll, Dassel
Röntgenfilme	Schütt, Göttingen
	Fuji; Düsseldorf; Kodak; Rochester, NYC

2.1.5. Radiochemikalien

Amersham Buchler GmbH (Braunschweig):

[α - 32 P] dCTP (6000 Ci/mmol; 10 mCi/ml; Redivue; wässrige Lösung)

[α - 35 S] dATP (>1000 Ci/mmol; 10 mCi/ml; Redivue; wässrige Lösung)

D-threo-[Dichloracetyl-1- 14 C] Chloramphenicol (57 mCi/mmol; 25 μ Ci/ml; 0,25M TrisPuffer pH7,5)

NEN-Life Science Products (Köln)

[24,25,26,27- 3 H(N)]-Ponasterone A (170 Ci/mmol; 1 mCi/ml; in Ethanol)

2.2. Puffer und Stammlösungen

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch in der Molekularbiologie wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt. Die benötigten Chemikalien wurden den Erfordernissen gemäß mit bidestilliertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert, sterilisiert, bzw. sterilfiltriert.

Chloropan:	pro Liter: 500 ml mit TE pH8,0 gesättigtes Phenol mit 500 ml Chloroform mischen. 0,5 g 8-Hydroxychinolin (f.c. 0,5 %) zugeben.
Denhardts-Lösung (50x)	1 % Rinderserumalbumin, 1 % Polyvinylpyrrolidin, 1 % Ficoll 400
Denaturierungslösung	1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH
GET-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM Glucose, 10 mM EDTA
1 x HBS-Puffer	0,15 M NaCl, 0,005 M KCl, 0,0007 M Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 0,02 M Hepes, pH7,05 mit NaOH

1 x HEPES-Puffer	7,07 g/l NaCl, 0,4 g/l KCl, 0,06 g/l KH_2PO_4 , 0,08g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l Glucose, 0,01 g/l Phenolrot, 4,8g/l Hepes; pH der Lösung: pH7,3; Osmolarität 290
Hybridisierungslösung I (Nitrozellulosefilter)	50 % Formamid; 0,5 x SSPE; 0,1 % SSC; 10% Denhardts-Lösung, 3% Heringperm-DNA (10mg/ml)
Hybridisierungslösung II (Church-Puffer)	0,5 M NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA pH8, 0,7 % SDS
Heringperm-DNA	1 g DNA in 50 ml H_2O (f.c. 20 mg/ml) lösen. DNA in einem Ultraschall Homogenisator (2 x 10 Min) sonifizieren, 10 min. kochen und in Aliquots bei -20°C lagern. DNA vor Gebrauch erneut 5 min kochen.
LB-Agar	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar, (auf 1 l H_2O , pH7.2)
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, (auf 1 l H_2O , pH7.2)
PBS	8.1 mM Na_2HPO_4 ; 1.5 mM K_2HPO_4 ; 140 mM NaCl; 13 mM KCl
Sample Buffer (6x)	98 % Formamid, 1 mM EDTA, 0.3 % Bromphenolblau, 0.3 % Xylencyanol
20 x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat (pH 7)
20 x SSPE	3M NaCl; 0,2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 0,02 M EDTA; pH7,4
50 x TAE	2 M Tris-HCl (pH 8); 1M Essigsäure; 50 mM EDTA
TBE (5 x)	445mM Tris-HCl (pH8.2), 445mM Borsäure, 10mM EDTA

TE-Puffer

10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA

2.3. Bakterienstämme

Es wurden folgende *E.coli* Bakterienstämme verwendet:

SURE	Fa. Stratagene (Heidelberg) (e14(McrA ⁻)Δ(mcrCB-hsdSmR-mrr)171endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan ^r) uvrC [F'proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)] ^c
XL1-Blue	Fa. Stratagene (Heidelberg) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)] ^c

2.4. Klonierungsvektoren

Es wurden folgende Plasmid-Vektoren und Expressionsvektoren zur Verfügung gestellt:

p cos myf5 [KpnI x EcoRI] #7	freundlicherweise von Prof. Dr. T. Braun zur Verfügung gestellt (Braun et al., 1995)
pBluescript [®] KSII ⁺ (pKSII ⁺)	(GenBank-Nr.:X52327 [KS(+)]); Fa. Stratagene, Heidelberg)
pG5 / pG11 CAT-Reporter	freundlicherweise von Prof. Dr. T. Braun zur Verfügung gestellt
pG4 M polyII	freundlicherweise von Prof. Dr. T. Braun zur Verfügung gestellt
pGEM [®] -7Zf(+/-)	(GenBank-Nr.:X65311 [Zf(-)]); Fa. Promega, Mannheim)
pGH1	freundlicherweise von Dr. H. Gu, Institut für Genetik, Köln, zur Verfügung gestellt (Gu, H. et al., 1993)
pGS5 mRXXRα	freundlicherweise von Prof. P. Chambon, CNRS INSERM/Strasbourg/F, zur Verfügung gestellt

pHRC myf6#19C	freundlicherweise von Prof. Dr. T. Braun zur Verfügung gestellt (Braun et al., 1995)
pKJ-1	(Adra et al., 1987)
pKSVP16	freundlicherweise von PD Dr. E. Bober zur Verfügung gestellt
pM#3	freundlicherweise von Dr. R. Zweigerdt zur Verfügung gestellt (Braun et al., 1995)
pMC1 neo polyA	Fa. Stratagene, Heidelberg, (Thomas und Capecchi, 1987)
pMC-Cre	freundlicherweise von Dr. H. Gu, Institut für Genetik, Köln, zur Verfügung gestellt (Gu, H. et al., 1993)
pMK1	freundlicherweise von Dr. M. Koelle zur Verfügung gestellt (Koelle et al., 1991)
pPGKpaX1 (pPac1)	freundlicherweise von Dr. F. Steward, EMBL, Heidelberg, zur Verfügung gestellt (Kellendonk et al., 1996)
pRCAS(A)AP	freundlicherweise von Prof. Dr. T. Braun zur Verfügung gestellt
pRSVlacZ	freundlicherweise von Prof. Dr. T. Braun zur Verfügung gestellt
pSG5new USP	freundlicherweise von Prof. R. M. Evans, zur Verfügung gestellt (Oro et al., 1990)
pVgRXR, pIND, pIND/lacZ	Fa. Invitrogen (Leek); (No et al., 1996)

2.5. Antibiotika

Es wurden Stammlösungen der Antibiotika angesetzt, die steril filtriert und bei -20 °C gelagert wurden. Die jeweils benötigten Lösungen wurden den Wachstumsmedien erst nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf 55 °C zugegeben.

Ampicillin-Stammlösung: 50 mg/ml H₂O

2.6. Verwendete Oligonukleotide

Sämtliche Sequenzen wurden in 5' → 3' Orientierung angegeben:

2.6.1. (PCR-vermittelte) Amplifikation von DNA-Fragmenten zwecks Subklonierung

Folgende Oligonukleotide wurden zur PCR-vermittelten Amplifikation von DNA-Sequenzen verwendet. (Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind *kursiv*; START-, bzw. STOP-Codons sind **fett** hervorgehoben.) Eine Ausnahme bilden die Oligonukleotide in C), die direkt für eine Subklonierung eingesetzt wurden.

A) *Cre*-Rekombinase

	<i>EagI</i>	<i>SacI</i>	<i>cre</i> -codierende Region →
5CRE/S	AGTCCGGCCGACAT TGGAGCTCCGGCCCAAGAAGAAGAGGA		
	AGGTG		
	<i>NaeI</i>	<i>KpnI</i>	← <i>cre</i> -codierende Region
3CRE/K	GACTGCCGGCCTATCTAGGTACCGCATCGCCATCTTCCAGC		
	AGGCG		

B) *E-Region* des Ecdyson-Rezeptors

	<i>KpnI</i>	<i>E-Region</i> (bp2359-2383) →
5ECRK	AGTCGGTACCTGATCAGGATGGCTATGAGCAGCCATCT	
	<i>KpnI</i>	← <i>E-Region</i> (bp2998-3022)
3ECRK (SUPER)	GACTGGTACCGCGTCCCAGATCTCCTCGAGGAAGT	
	<i>SacI</i>	<i>E-Region</i> (bp2359-2383) →
5ECRS	AGTCGAGCTCGCTCAGGATGGCTATGAGCAGCCATCT	
	<i>SacI</i>	← <i>E-Region</i> (bp2998-3022)
3ECRS	GACTGAGCTCGACGTCCCAGATCTCCTCGAGGAAGT	

Diese Primer waren für eine direkte Subklonierung bestimmt. Sie waren so konstruiert, daß nach dem Annealing der jeweiligen „HIN“ und „HER“ Primer ein Fragment mit einem degeneriertem *KpnI* Linker entstand, der nach erfolgter Ligation nicht mehr gespalten werden konnte. Zum Annealing wurden die Oligos für 10 Minuten bei 100 °C denaturiert und anschließend langsam auf RT abgekühlt (siehe 2.9.3.). Die Subklonierungen fanden in einem Verhältnis von 10:1 mit dem *KpnI* gespaltenen Vektor pBluescriptKSII über Nacht bei 16 °C statt.

AflIII *KpnI* *loxP*

ACTTAAGGGTACCATAACTTCGTATAGCATACATTA

*Cl*I *A*flII

TACGAAGTTATATCGATCTTAAGTGTAC

AflIII *ClaI* *loxP*

ACTTAAGATCGATATAACTTCGTATAATGTATGCTA

KpnI *AflIII*
TACGAAGTTATGGTACCCTTAAGTGTAC

SalI *KpnI* *loxP*

AGTCGACGGTACCATAACTTCGTATAGCATACATTAT

EcoRI
ACGAAGTTATGAATTCTGTAC

EcoRI *loxP*
AGAATTCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAG

KpnI *Sall*
TTATGGTACCGTCGACTGTAC

D) GAL4-E-Region-Fusionen (E-Region ist **fett** gedruckt)

ClaI ***E-Region (bp2349-2371) →***

5'GEpoly ATGCATCGATGGGAATTTGGTACCAGGATGGCTATG

ClaI ***← E-Region (bp3021-3042)***

3'Geprev ATGCATCGATGCCGATGGCGGGATGGCATGAACG

E) Cre-Rekombinase / Cre-Fusionen (Sequenzen aus pMCCre1.12, etc. sind **fett** gedruckt, siehe 2.9.9.)

EcoRI ***pMCCre1.12(bp756-774) →***

5'SOFT GACTGAATTCGGATTGCACGCAGGTTCT

EcoRI ***← z.B. pMC1neopolyA (bp1379-1396)***

3'HARD GACTGAATTCTGATAGCGGTCCGCCACA

2.6.2. Oligonukleotide für eine RT-PCR

Folgende Primer wurden für eine RT-PCR verwendet:

A) Cre-Rekombinase

Crefor	TCGCAAGAACCTGATGGAC
Crerevlon	AATCCCCAGAAATGCCAG
Annealing Temp.	52 °C
Amplifiziertes Fragment	430 bp

B) Alkalische Phosphatase

APfor	CTACGCAGCTCATCTCCAAC
APrev	ATTCCTGCACCAGATTCTTCC
Annealing Temp.	52 °C
Amplifiziertes Fragment	150 bp

**2.6.3. Oligonukleotide für eine PCR nach einem „Splicing of Overlap-Extension“
Protokoll (Horton et al., 1989)**

(Die folgenden Oligonukleotide wurden mir freundlicherweise von Dr. S. Hornung zur Verfügung gestellt.)

Die Linkerregionen sind **fett**, Schnittstellen für *HpaI* sind **fett** und *kursiv* gedruckt.

P1	TAATACGACTCACTATAGGG
P2-Linker	AT ACCGGATCCAGAACCTGCAGTCGTCGAGTGCTCCG A
P3-Linker	GCAGGTTCTGGATCCGGTATGGACACCAAACATTTC CT
	<i>HpaI</i>
P2-HpaI	GGTGTCCATGTTAACTGCAGTCGTCGAGTGCTCCGA
	<i>HpaI</i>
P3-HpaI	ACGACTGCAGTTAACATGGACACCAAACATTTCCT
P4	CCCTCTAGCTAGATGCATG

2.6.4. Sonstige Primer

Cre-40	TCCGTAACCTGGATAGT
Crerev	GCAGGCAAATTTTGGTG
GAL-4-primer	GTGCGACATCATCATCG
GPSA-primer	GCGTTGCGTGGGGTCAGGTC
MC-40	ACCCTGCAGCCAATATG
MCrev	CTTCAGCAATATCACGG
pUC/M13-20 primer	TGACCGGCAGCAAAATG
pUC/M13-40 primer	GTTTTCCCAGTCACGAC
Reverse primer	GGAAACAGCTATGACCATG
SILV-primer	GGACGTAAACTCCTCTTC
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	CGGGATATCACTCAGCATAATG

2.7. Art und Herkunft der kultivierten Zellen

C3H10T1/2 Zellen	Renzikoff et al., 1973; ATCC-Nr. CCL-226
J1-ES-Zellen	Li et al., 1992; Parentaler Stamm 129/Sv (A/A; c ^{ch} p/c ^{ch} p; Haplotyp: X/Y; Stevens und Little, 1954)
SLN-Zellen	STO-Zell-Derivat (Martin und Evans, 1975), stabil transfiziert

mit einem Hygromycin-Resistenz- und einem LIF-Expressionsvektor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Braun)

Feeder-Zellen Embryonale Fibroblasten (EMFI) Zelllinie; Primärzelllinie; (FVB/ β_2 Mikroglobulin^{-/-}; X/X; X/Y) / siehe 2.9.

2.8. Mausstämme

Blastozysten wurden nach natürlichen Verpaarungen aus den folgenden Mausstämmen (*Mus musculus*; Auffrey et al., 1990) isoliert:

Stamm	Agouti;Tyrosinase
<i>C57BL/6J</i>	(a/a; C/C)
<i>Balb/c</i>	(A/A; c/c)

Als *Ammen-Mütter* dienten Mäuse des Stammes B6D2F1, der eine F1-Generation aus einer Kreuzung zwischen den Stämmen C57/Bl6 und DBA darstellt. Sterile Männchen für die Bereitstellung pseudoträchtiger B6D2F 1-Weibchen wurden durch Vasektomierung von Männchen des Stammes ICR (Taketo et al., 1991) nach den Angaben von Hogan et al. (1994) generiert.

Alle Mäuse wurden entweder über die Firma Harlan-Winkelmann bezogen, oder stammten aus der Eigenzucht.

Als Quelle für die Gewinnung embryonaler Feederzellen dienten homozygote und heterozygote Embryonen des β_2 -Mikroglobulin Stammes (Zijlstra et al., 1990). Als Stammbhintergrund diente entweder FVB oder B6D2F1.

2.9. Molekularbiologische Techniken

2.9.1. Standardbedingungen und -methoden der Molekularbiologie

Alle gentechnologischen Arbeitsschritte wurden nach molekularbiologischen Standardmethoden unter Beachtung entsprechender Sicherheitsvorschriften (z.B. Gentechnikgesetz) durchgeführt. Reagenzien und Proben für die Vorbereitung enzymatischer Reaktionen wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt. Verwendete Medien, Puffer und sonstige Lösungen wurden mit

bidestilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert. Sofern nicht näher erwähnt, wurden folgende Standardmethoden nach „*Molecular cloning*“ (Sambrook et al., 1989) und „*Current Protocols in Molecular Biology*“ (Ausubel et al., 1992) durchgeführt:

Agarose-Gelelektrophorese von DNA und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelelen (Elektroporation); Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden und Abspalten von 3'-überhängenden DNA-Enden mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase oder mit T4-DNA-Polymerase; Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren; Dephosphorylierung von DNA-Enden; Kinasierung von DNA-Fragmenten; Ligation und Subklonierung von DNA-Fragmenten; photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren; Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* XL1-Blue Zellen im analytischen Maßstab („Mini- bzw. Maxi-Prep“); Präzipitation von Nukleinsäuren; Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen; Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen. Sequenzreaktionen wurden nach der Methode von Sanger et al. (1977) unter Verwendung des „*Sequenase-Version-2.0-DNA-Sequencing-Kits*“ (Fa. Amersham, Braunschweig) durchgeführt.

2.9.2. Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren

2.9.2.1. Isolierung genomischer DNA aus tierischen Geweben und kultivierten Zellen

Zur Isolation genomischer DNA wurde die Methode von Laird et al. (1991) angewandt, die für die Analyse tierischer Gewebe oder adhärenter Zellen in der Zellkultur in größerem Maßstab konzipiert wurde. Bei dieser Methode blieb die DNA durch die Inaktivierung endogener Nukleasen durch Proteinase K intakt.

Mäuse, deren durchschnittliches Alter 3-6 Wochen betrug, wurden mit Hilfe von Diethylether kurzzeitig betäubt. Ca. 1cm der (noch knorpeligen) Schwanzspitze wurde bei Raumtemperatur in 500 µl Lysis-Puffer (100 mM Tris-HCl pH8,5; 5 mM EDTA; 0,2 % SDS; 200 mM NaCl; 100 µl Proteinase K [10mg/ml]) überführt und ü.N. bei 55 °C und ständiger Bewegung inkubiert. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde der klare Überstand mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die dabei ausgefallene DNA wurde nach erneuter zehnminütiger Zentrifugation in einer Eppendorf Tischzentrifuge präzipitiert und nach einem Waschschrift in 70 % Ethanol in 100 µl TE gelöst und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert.

Zur Gewinnung genomischer DNA aus kultivierten Zellen wurde je eine 24 Loch-Schale (Nunc) mit 500 µl Lysis-Mix ü.N. oder auch bis zu 3 Tagen behandelt.

2.9.2.2. Isolierung von cytoplasmatischer RNA aus kultivierten Zellen

Die auf Eis gekühlten Zellen aus 24-well-Schalen wurden zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und mit 300 µl eiskaltem IsoB-NP40 (10 mM Tris-HCl pH7,9; 0,15 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,65 % Nonidet-P40) lysiert. Nach Transfer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und Zentrifugation wurden 200 µl des Überstandes mit 400 µl IsoB-NP40 und 120 µl 5xRPL (500 mM Tris-HCl pH9,0; 50 mM EDTA; 2,5 % SDS) versetzt. Daran schloß sich zwei Chloroform-Extraktionen an. Die wässrige Phase wurde 40 µl 5 M NaCl in 1 ml Isopropanol für mehr als drei Stunden bei -20 °C präzipitiert. Das Pellet wurde nach einem Waschschriff in 80 % Ethanol in 40 µl H₂O aufgenommen und einer DNase-Spaltung unterzogen. Anschließend stand die RNA zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

2.9.3. Hybridisierung von Oligos zur Generierung von doppelsträngiger DNA

Sollten zwei komplementäre Oligos miteinander hybridisiert werden, um doppelsträngige DNA-Fragmente zu erhalten, wurden jeweils 10µg der entsprechenden DNA-Einzelstränge zunächst für 5 Min. bei 100 °C in Puffer M (10 mM Tris-HCl pH7,5; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 1 mM DTE; Fa. Boehringer Mannheim) gekocht und dann langsam auf RT abgekühlt. Das so gebildete doppelsträngige DNA-Molekül wurde dann in 0,2 M NaCl, 0,01 M MgCl₂ und 4-5 Vol. Ethanol präzipitiert und anschließend kinasiert. Im Anschluß daran wurde die DNA mit Hilfe einer Chloroform-Extraktion und einer weiteren Präzipitation gereinigt und aufkonzentriert. Das DNA-Fragment stand nun für eine Subklonierung zur Verfügung.

2.9.4. Southern-Transfer von DNA auf Polyamid-Membran

In der vorliegenden Arbeit wurden alkalische Southern-Blots nach der Methode von Ausubel et al.(1992) durchgeführt. Dazu wurde die DNA zunächst 10 min in 0,45 % HCl depuriniert und unverzüglich in 0,4 M NaOH über Nacht auf eine positiv geladene Polyamidmembran transferiert. Die Membran wurde kurz in 2 x SSC gewaschen und die DNA entweder unter UV oder im Vakuum-Ofen für 2 h bei 80 °C fixiert. Es schloß sich ein einstündiger Waschschritt in 0,1 x SSC und 0,5 % SDS bei 65 °C an. Die Prähybridisierung erfolgte in 50 ml Church-Puffer in 0,2 mg/ml Heringsspermien-DNA (Hybridisierungslösung II) bei 65 °C. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls in Church Puffer bei 65 °C. Die Menge an radioaktiv-markierter Probe variierte zwischen 500000 Cpm/ml (für die Detektion von Plasmid-DNA) und 2x10⁶ Cpm/ml (für die Detektion von genomischer DNA). Die Hybridisierung wurde mindestens für eine Dauer von 8 Stunden durchgeführt. Die Membran wurde anschließend eine Stunde bei 65 °C in 0,04 M NaH₂PO₄ und 1 % SDS gewaschen. Bei Bedarf wurde die hy-

bridisierte Probe in 0,4 N NaOH für 30 min. bei 65 °C abgewaschen. Die Membran wurde danach in 0,1 x SSC / 0,5 % SDS und 0,2 M Tris-HCl pH7,5 neutralisiert.

2.9.5. Markierung von Nukleinsäuren durch *Random-Priming*

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Sonden wurde das *Multiprime* System der Firma Amersham (Braunschweig) verwendet, dem eine modifizierte Methode des „Random-Priming“ (Feinberg und Vogelstein, 1984) zugrunde liegt. Diese Methode der radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten ermöglicht eine hohe Ausbeute an spezifisch radioaktiv markierten DNA-Sonden ($1-5 \times 10^9$ cpm / μg DNA). Dazu wurde die doppelsträngige DNA zunächst für 5 min. bei 95 °C denaturiert und mit einem Starter-Oligo (dN)₆ versetzt. Unter Zusatz von dNTPs, [α -³²P] dCTP und Klenow-Polymerase wurden radioaktive DNA-Stränge neu synthetisiert. Es wurden 150 ng DNA und je 50 μCi [α -³²P] dCTP für das „*Random-Priming*“ eingesetzt und die Markierung der DNA-Stränge wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μl H₂O, 70 μg Glykogen, 100 μl 4 M NaAc (pH 4.8) und 400 μl Ethanol abgestoppt. Es folgte eine selektive Präzipitation auf Trockeneis bei –80 °C. Die markierte Sonde wurde durch Zentrifugation (15 min., 13000 x g) pelletiert, zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in 100 μl TE (pH8.0) resuspendiert.

2.9.6. Exposition von Autoradiogrammen

Je nach Aktivität der Autoradiogramme wurden Filme verschiedener Empfindlichkeit verwendet. In lichtundurchlässigen Kassetten wurde das getrocknete Gel, bzw. der Filter mit einem plan aufliegendem Film exponiert. Die Dauer und Temperatur der Exposition richteten sich dabei nach der Aktivität des Autoradiogrammes. Bei Sequenzgelen und Southern-Blots wurden üblicherweise die empfindlicheren Kodak-Filme (Kodak X- AR5) verwendet.

2.9.7. Kolonie-Hybridisierung von Bakterienkolonien mit radioaktiven Sonden

Auf die Bakterienkolonien wurden Nitrozellulosefilter (Hybond BA 85, Schleicher & Schuell) gelegt und die Orientierung der Filter markiert. Anschließend wurden die Filter abgezogen und die darauf haftenden Bakterienkolonien lysiert. Dies geschah, indem die Filter mit den Kolonien nach oben nacheinander auf 3 mit verschiedenen Lösungen getränkte Whatmanfilter 3MM gelegt wurden: 5 min. Lösung 1 (0,5 M NaOH), 5 min. Lösung 2 (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris HCl pH7,4) und 5 min. Lösung 3 (1,5 M NaCl, 2 x SSC). Anschließend wurden die Nitrozellulosefilter luftgetrocknet und die aus den Bakterienkolonien durch die Lyse freigelegte DNA durch zweistündiges Backen bei 80 °C immobilisiert. Danach wurden die Filter mit 30 ml Hybridisierungslösung I für 3 h bei 42 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde

die Hybridisierungslösung dekantiert und durch 15-20 ml Hybridisierungslösung ersetzt, der die denaturierte radioaktive Sonde (5 min. bei 95 °C) beigelegt war ($0,5 \cdot 10^6$ counts/ml). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C. Anschließend wurden die Filter mehrmals mit $0,1 \times \text{SSC} / 0,1 \% \text{ SDS}$ gewaschen und bei -80 °C mit einem Kodak- Röntgenfilm exponiert.

2.9.8. PCR

Alle PCR-Anwendungen wurden an Protokolle aus „PCR1“ and „PCR2“ aus der „Practical Approach“ Serie (Mc Pherson et al., 1991, 1995) angelehnt.

2.9.8.1. Primer-Design

Das Design von Primer-Paaren ist für PCR-Reaktionen von entscheidender Bedeutung und wurde nach folgenden Grundregeln durchgeführt: Die Länge eines PCR-Primers sollte zwischen 17 und 27 Basen liegen. Die Schmelztemperaturen beider Primer eines Primer-paares waren nach Möglichkeit identisch. Die Kenntnis der Schmelztemperaturen ist für die Festlegung der Annealing-Temperatur, das ist die Temperatur, bei der ein Primer spezifisch und stabil an eine DNA-Matrize hybridisiert, notwendig. Die Berechnung der Schmelztemperatur eines Primers in einer PCR-Reaktion ist von den Salz- und Tris-HCl – Konzentrationen im Reaktionspuffer, sowie von der Länge, der Konzentration und der Sequenz des Primers abhängig. Die AnnealingTemperatur T_{an} wurde nach der Formel:

$$T_{an} = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) - (0 \text{ bis } 10)$$

berechnet, wobei T_{an} maximal gleich der optimalen Synthesetemperatur der thermostabilen DNA-Polymerase ist (70-74°C). Die durch PCR zu generierenden DNA-Fragmente hatten für Nachweisreaktionen eine Länge von etwa 100 - 500 bp. Bei der Amplifizierung von DNA zwecks Subklonierung konnten diese DNA-Fragmente aber eine Länge von bis zu 2 kb erreichen. In einigen Fällen wurde das Design von Primern durch die Computerprogramme „GeneJockey“ (Biosoft, Cambridge, UK) und „Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8.0“ (Genetics Computer Group, Madison, WI, USA) unterstützt. Die hierdurch vorgeschlagenen Primer wurden nach o.g. Regeln überprüft und ggf. modifiziert. Die Kontrolle möglicher Primer-Dimerisierungen wurden mit dem Programm „Amplify“ (University of Wisconsin, Genetics, Madison, WI, USA) durchgeführt. Die Konzentration der Primer in OD-Einheiten wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Ihre Molaritäten wurden nach der Formel

$$\text{Anzahl der pmole} = \text{Gesamt (OD}_{260}) / (10 \times N)$$

berechnet, wobei N die Anzahl der Nukleotide im Oligo war.

2.9.8.2. Standard-PCR

Standard-PCR-Anwendungen wurden nach Protokolle aus dem Handbuch von McPherson et al. (1991) durchgeführt. Soweit nicht anders erwähnt, erfolgten PCR-Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 50 oder 100 μ l. Zur der DNA wurde folgender Standard-PCR-Mix gegeben:

Standard-PCR-Mix:

sense (5')-Primer:	100 pM
antisense (3')-Primer:	100 pM
dNTP's:	jeweils 0,2 mM
10 x Reaktionspuffer:	1 x
MgCl ₂ :	1,5 - 3 mM
Thermus aquaticus (Taq)-DNA-Polymerase:	0,025 U / μ l

Die eingesetzte DNA-Menge war bei verschiedenen PCR-Verfahren unterschiedlich (s.u.). Bei mehr als einer PCR-Reaktion mit identischen Primer-Paaren wurden grundsätzlich sogenannte Master-Mixe, bestehend aus den o.g. Komponenten ohne DNA, hergestellt und dieser dann zur DNA pipettiert. Je nach Volumen wurde der Reaktionsansatz mit 1 (bei 50 μ l) bzw. 2 (bei 100 μ l) Tropfen Mineralöl überschichtet. In Fällen, in denen die PCR-Maschine mit einer Deckelheizung ausgestattet war, entfiel die Überschichtung mit Mineralöl.

2.9.8.3. Amplifikation von DNA zwecks Subklonierung

In manchen Fragestellungen wurden mit Hilfe von PCR-Methoden DNA-Fragmente generiert, die anschließend zur Subklonierung verwendet wurden. Dabei mußten Punktmutationen in dem amplifiziertem Fragment möglichst ausgeschlossen werden. Zudem sollten die DNA-Fragmente durch einfache Ligationen subklonierbar sein.

Ersteres wurde durch den Einsatz sogenannter Exo⁻ hitzestabiler Polymerasen erreicht (z.B. Vent_RTM (exo⁻) (Fa. Biolabs, Schwalbach), Ex TaqTM (Fa. Takara/Boehringer Ingelheim). Diese Polymerasen besitzen eine Fehlerlese-Funktion und sind in der Lage, fehlerhafte Basenpaarungen zu korrigieren. Die Zyklenzahlen sind so niedrig wie möglich zu halten, um Punktmutationen in dem Amplifikat zu vermeiden.

Letzteres wurde im Allgemeinen durch die Addition von Linkersegmenten an die Primerpaare ermöglicht. Diese Linkersegmente, die sich 5' an die jeweiligen Primer angefügt waren, sind zur amplifizierten Sequenz nicht homolog, dürfen also eine gewisse Länge nicht

überschreiten. Nach erfolgter Amplifizierung des gewünschten DNA-Fragmentes erfolgte eine restriktionsenzymatische Spaltung, an die sich eine Aufreinigung des Fragmentes durch ein Agarosegel anschloß. Die somit aufgereinigte DNA konnte für Subklonierungen eingesetzt werden.

2.9.8.4. RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) war eine empfindliche Methode zum Nachweis von spezifischen mRNA's. 2 µg Gesamt-RNA (2.9.2.2.) wurden in Gegenwart von 0,5 µg oligo p(dT)₁₅-Primer in einem Volumen von 13 µl für 5 min. bei 70 °C erwärmt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Hierbei hybridisierte der Primer an die poly(A)-Abschnitte der mRNA. Die cDNA-Erststrangsynthese wurde durch Zugabe von 5 µl 5 x konzentriertem AMV-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei 42 °C; 250 mM KCl; 50 mM MgCl₂; 2,5 mM Spermidin), 2,5 µl DTT, 2,5 µl 10 mM dNTP's, 0,7 µl [40 U/µl] RNA'se-Inhibitor (RNA'sin; 25 U gesamt), 0,65 µl Wasser und 0,65 µl [23 U/µl] Avian-Myeloblastosis-Virus-Reverse-Transkriptase (AMV-RT) (15 U gesamt) und Inkubation für 60-120 min. bei 42 °C durchgeführt. Bei mehr als einer Erststrangsynthese-Reaktion wurde aus diesen Komponenten ein Mix hergestellt und 12 µl hiervon zu den 13 µl der Hybridisierungs-Reaktionsansätze pipettiert. Die Reaktion wurde danach durch Erhitzen bei 95 °C für 2 min. gestoppt. Der Ansatz wurde mit 75 µl Wasser verdünnt. 5 µl wurden anschließend für Standard PCR-Reaktionen mit variabler Zyklenanzahl verwendet. 20 µl der PCR-Ansätze wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.9.8.5. Semiquantitative PCR

Da die Standard-PCR nicht für eine quantitative DNA-Bestimmung eingesetzt werden konnte, wurden bestimmte PCR-Bedingungen ermittelt, die eine semiquantitative PCR ermöglichten. Diese wurde verwendet, um bestimmte DNA-Konzentrationen (oder indirekt RNA-Konzentrationen [RT-PCR, Abschnitt 2.9.11.4.]) eines Zell-Lysates zu bestimmen.

Man benötigte dazu zwei Primerpaare, die jeweils spezifisch ein bestimmten exprimierten DNA-Abschnitt nachwiesen.

Das eine Primerpaar wurde hierbei als Standard benutzt und amplifizierte ein konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen. In einer ersten Versuchsreihe wurde bestimmt, wie viele PCR-Zyklen durchgeführt werden konnten, ehe das PCR-Fragment die logarithmische Amplifikationsphase verließ. Die Intensität der amplifizierten DNA-Fragmente nahm bis zum Verlassen dieser Phase zunehmen. Anschließend konnten nun verschiedene Zell-Lysate miteinander abgeglichen werden, indem man jeweils nur so viel Zell-Lysat für die PCR einsetzte, daß das mit dem ersten Primerpaar amplifizierte Haushaltsgen in allen Reaktionen die gleiche Bandenintensität erzielte. Die Intensität ließ sich entweder mit dem bloßen Auge abschätzen

oder wurde durch densitometrische Bestimmungen mit Hilfe der *NIH Image 1.54* Software (*Anonymous FTP: zippy.nimh.nih.gov [128.231.98.32]*) bestimmt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Konzentration des gesuchten DNA/RNA-Abschnitts (s.o.) ermittelt. Mit Hilfe des zweiten Primerpaares wurde dieses Fragment amplifiziert, wobei man die vorher ermittelten Zell-Lysat Volumina für das erste amplifizierte DNA-Fragment verwendete. Die somit erhaltene Bandenintensität für das zweite amplifizierte Fragment war proportional zur Konzentration des zweiten Fragmentes. War die Konzentration des ersten Fragmentes bekannt (Eichkurve), ließ sich eine absolute Konzentrationsangabe für das zweite DNA-Fragment angeben.

2.9.8.6. *Splicing by Overlap Extension*

Wenn zwei PCR Produkte überlappende komplementäre Enden besaßen, konnten sie sich aneinanderlagern und ein Hybrid Produkt bilden. Eine zweite PCR, die mit zwei Primern in der nicht-überlappenden Region durchgeführt wurde, resultierte in einer Amplifikation dieses Hybrides. Dieses Prinzip nennt man *Splicing by Overlap Extension*. Es konnte dazu verwendet werden, zwei unterschiedliche Sequenzen in einer definierten Reihenfolge miteinander zu verbinden. Die Sequenz des Übergangs konnte dabei frei gewählt werden. Wichtig ist ein Reinigungsschritt zwischen den PCR-Schritten, um das erste PCR-Produkt aufzureinigen. Außerdem sollten eventuell überhängende 3' Nukleotide mit der Klenow Polymerase entfernt werden, da sie sonst mit in das Fusionsprodukt inkorporiert wurden. Die Zyklenzahlen waren so niedrig wie möglich zu halten, um Punktmutationen in dem Amplifikat zu vermeiden (Horton et al., 1989).

Arbeitsschritte:

- A) Primäre PCR, um zwei Fragmente mit komplementären Überhang zu erhalten
- B) Entfernung überhängender nicht komplementärer 3' Nukleotide mit Hilfe der Klenow-Polymerase
- C) Gelaufreinigung der DNA und Elektroelution
- D) Sekundäre PCR, um Ziel-DNA-Fragment zu erhalten
- E) Isolation des gewünschten Fragmentes und Subklonierung

2.9.9. Klonierung wichtiger Konstrukte

2.9.9.1. Hybridmoleküle aus der GAL4-DNA Bindungsdomäne und dem Ecdyson-Rezeptor

Als Ausgangsprodukte für die Klonierungen dienten die Plasmide pG4MpolyII, pKSVP16 sowie pMK1. Zur Herstellung von pGAL4-VP16 wurde das VP16-Fragment aus pKSVP16

mit *XhoI* Linkern versehen und unter Beachtung des Leserasters in das mit *XhoI* gespaltene pG4MpolyII Plasmid kloniert.

Zur Herstellung von pGAL-EcR wurde pMK1, der die EcR-cDNA enthält, *AflIII* komplett /EcoN1 partiell geschnitten und mit *ClaI* Linkern versehen, wobei wiederum das Leseraster beachtet werden mußte. Anschließend wurde es mit dem *ClaI* gespaltenen pG4MpolyII Plasmid ligiert.

Die E-Domäne für die Konstrukte GAL4-E und GAL4-E-VP16 wurde mit Hilfe der Oligonukleotide 5'GEpoly und 3'GEporev aus dem Vektor pMK1 via PCR amplifiziert (Expand High Fidelity System, Fa. Boehringer Mannheim / $T_{an} = 60\text{ °C}$; 16 Zyklen). Das PCR-Fragment wurde mit *ClaI* gespalten und anschließend mit *ClaI* geschnittenem pG4MpolyII, bzw. pGAL4-VP16 ligiert, um GAL4-E, bzw. GAL4-E-VP16 zu generieren. Schließlich wurde der Leseraster aller Konstrukte durch Sequenzierung überprüft.

2.9.9.2. Cre-E-Domänen Fusionen

Die Cre Rekombinase wurde zunächst neu subkloniert, um Schnittstellen für eine Insertion von E-Domänen zu schaffen. Als Ausgangsplasmid diente hierbei pMC-Cre, aus der die Cre-Rekombinase wurde mittels PCR amplifiziert wurde. Die verwendeten Primer waren 5CRE/S sowie 3CRE/K. Als Polymerase diente die VentTM DNA-Polymerase (Fa. Biolabs, Schwalbach) mit 3'→5' Prüfkativität (weitere Bedingungen: $T_{an} = 60\text{ °C}$; $[MgSO_4] = 4\text{ mM}$; 30 Zyklen). Das amplifizierte Fragment von 1100 bp enthielt aufgrund der Primerkonzeption 5' bzw. 3' jeweils zwei Einzelspaltungsstellen, und zwar 5' *EagI* und *SacI* und 3' *KpnI* und *NaeI* (jeweils in 5'→3' Richtung des PCR-Fragmentes). Die amplifizierte Cre Rekombinase wurde *EagI* und *NaeI* gespalten und anschließend mit dem entsprechend gespaltenen Vektor pMC1neopolyA ligiert. Das daraus resultierende Konstrukt, pMC1.12, trug nun anstatt des Neomycin-Resistenzgens das Cre Rekombinase-Gen. Zwischen dem Startcodon und dem nukleären Lokalisationssignal der Cre Rekombinase befand sich im Leseraster eine *SacI* Spaltungsstelle. Die *EagI* Spaltungsstelle wurde so platziert, daß das endogene Startcodon von pMC1neopolyA ebenfalls im Leseraster mit dem der Cre Rekombinase lag. 3' von der *KpnI* Spaltungsstelle befanden sich zwei Stopcodons in zwei verschiedenen Leserastern. Das native Stopcodon der Cre Rekombinase wurde nicht mit amplifiziert. In die *SacI* und/oder die *KpnI* Spaltungsstelle wurden nun sukzessive die E-Domänen Fragmente einkloniert. Dabei wurde die 663 bp große E-Domäne ebenfalls via PCR amplifiziert, wobei zwei verschiedene PCR Reaktionen mit jeweils einem anderen Primerpaar durchgeführt wurden. Die generierten Fragmente waren auf diese Weise mit den geeigneten Schnittstellen für eine Insertion auf der 5' oder der 3' Seite der Cre Rekombinase versehen. Für die 5' E-Domäne wurden die Primer 5E^{CRK}, sowie 3E^{CRK}(SUPER); für die 3' E-Domäne die Primer 5E^{CRS}, sowie 3E^{CRS} verwendet (Bedingungen: VentTM DNA-Polymerase; $T_{an} = 70\text{ °C}$; $[MgSO_4]_{E^{CRK}} = 4\text{ mM}$; $[MgSO_4]_{E^{CRS}} = 4\text{--}6\text{ mM}$; 15 Zyklen). Anschließend wurden in den entsprechenden Ligationen

mit pMC1.12 die folgenden Konstrukte hergestellt: pEC, pECE; pCE sowie pCE₂. Dabei stand „C“ für die Cre Rekombinase und „E“ für die E-Domäne; die Schreibweise gab wieder, in welcher Reihenfolge die einzelnen Elemente ligiert wurden (siehe auch Abb. 7).

2.9.9.3. SOE-H/L

Die Klonierung von SOE-H und SOE-L wurde freundlicherweise von Dr. S. Hornung übernommen. Beide wurden mit der Methode des „Splicing of Overlap-Extension“ generiert. Für die erste Fusion SOE-H wurden die beiden Domänen in zwei getrennten PCRs mit Hilfe der Primer P1 und P2-Hpa1 für den VgEcR-Teil, sowie der Primer P3-Hpa1 und P4 für den RXR-Teil aus dem Konstrukt pVgRXR generiert. Das Fragment wurde in zehn Zyklen bei einer $T_{an}= 56\text{ °C}$ mit Hilfe der TaKaRa Taq-Polymerase amplifiziert. SOE-L wurde unter gleichen Bedingungen mit den Primern P1 und P2-Linker für die VgEcR-Domäne sowie P3-Linker und P4 für die RXR-Domäne ebenfalls aus VgRXR amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte isoliert und aufgereinigt. Zur Herstellung der Fusionen wurden mit den amplifizierten Domänen eine weitere PCR durchgeführt. Diesesmal wurden die jeweils zueinander passenden gelinkerten Domänen als Substrat verwendet. Als Primer wurden jeweils die äußeren Primer P1 und P4 eingesetzt. Die PCR wurde wiederum unter gleichen Bedingungen für 15 Zyklen durchgeführt. Die amplifizierten Fusionsprodukte wurden isoliert und dann mit den Enzymen *DraI* und *NotI* gespalten. Zum Abschluß wurden sie jeweils mit einem mit *DraI* und *NotI* gespaltenen und dephosphorylierten pVgRXR Vektor ligiert. Dieser Vektor bestand lediglich aus seinem „Rückrad“ und besaß kein Insert mehr.

2.9.9.4. INDCre

Die Cre kodierende cDNA Sequenz wurde aus dem Vektor pMC1.12 unter Verwendung der Primer 5'SOFT und 3'HARD amplifiziert. Nach Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* erfolgte die Insertion in den *EcoRI* gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pIND. Das entstandene Konstrukt wurde pINDCre genannt.

2.9.9.5. INDCre'E's

Zunächst wurden die einzelnen Hybride EC, CE und CE₂ mit Hilfe der Primer 5'SOFT und 3'HARD aus den Konstrukten pEC, pCE sowie CE₂ amplifiziert. Nach Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* erfolgte die Inserierung in den *EcoRI* gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pIND. Das entstandenen Konstrukte wurden pINDEC, pINDCE und pINDCE₂ genannt.

2.10. Proteinbiochemische Methoden

2.10.1. Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen

2.10.1.1. Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen für einen CAT-Assay (2.11.7.)

Die auf Eis gekühlten Zellen aus 6 cm Kulturschalen wurden zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und dann in einem Volumen von 1 ml eiskaltem 1 x PBS mit Hilfe eines Zellschabers von dem Gefäßboden abgeschabt und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zell-Lyse wurde durch dreimaliges Einfrieren der Zellen auf Trockeneis und anschließendem Auftauen im 37 °C Wasserbad durch die Bildung von Wasserkristallen bewirkt. Der Zelldebris wurde 10 min bei 13000 x g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße gegeben. Dieser stellt den Proteinextrakt für weitere Experimente dar und wird bei -20 °C gelagert.

2.10.1.2. Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen für einen Kompetitionsassay

Eine alternative Methode (aus „*Guide to Protein Purification*“, Deutscher et al., 1990) wurde bei der Gewinnung von Zellextrakten für die Kompetitionsassays (2.10.3) durchgeführt. Die auf Eis gekühlten Zellen aus 24-well-Platten wurden zweimal mit kaltem 1 x PBS (enthält 2mM EDTA) gewaschen. Nach der Präzipitation in einer Tischzentrifuge (5 min. bei 900 U/min) wurden die Zellen in 300 µl kaltem Puffer C (10 mM Tris-HCl pH7,5; 5 mM MgCl₂; 2 mM PMSF) aufgenommen, der mit Leupeptin und Trasylol als Proteaseinhibitoren versetzt war. Die Suspension wurde in Dounce-Röhrchen (Fa. B. Braun, Melsungen) überführt und mechanisch mit Hilfe eines Glasstabes lysiert. Anschließend wurde die Suspension mit 100 µl kaltem Puffer D (250 mM Tris-HCl pH7,5; 0,25 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 5 mM PMSF; 0,5 mM EDTA; 50 % Glycerol) versetzt und auf eine 0,3 M KCl Endkonzentration eingestellt. Debris wurde durch eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 4 °C entfernt. Der Zellextrakt wurde auf Eis gelagert, seine Proteinkonzentration (2.10.2.) bestimmt und anschließend in Aliquots bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.10.2. Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach der Bradford Methode durchgeführt (Bradford, M., 1976). Dabei wurde ein Assay der Fa. Bio-Rad, München verwendet. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

2.10.3. Liganden-Bindungs-Kompetitionsassay

Um die spezifische Bindung von Ecdysone-Derivaten an den Ecdysone-Rezeptor-Fusionen nachzuweisen, wurden Liganden-Bindungs-Kompetitionsassay (Protokoll nach Nichols, M. et al., 1998) durchgeführt. Dabei wurde nicht radioaktiv markierter Ligand gegen radioaktiv markierten Ligand titriert. 0,1 mg/ml Proteinextrakt wurde auf Eis mit einer festgesetzten Konzentration (1 nM) von radioaktiv markiertem ^3H -Ponasterone A (170 Ci/mmol; NEN Life Science; Köln), das vorher mit ansteigenden Mengen an nicht radioaktiv markiertem Muristerone A (0, 1, 10, 50, 100 nM) in Glasgefäßen gemischt worden war, versetzt. Die Kompetitionsassay fand anschließend bei 4 °C für 16 Stunden in einem Volumen von 300 µl in PMMG-Puffer (8,5 mM Na₂HPO₄ pH7,5; 1,5 mM KH₂PO₄ pH7,5; 10 mM Natriummolybdat; 2 mM Monothioglycerol; 20 % Glycerol) statt. Nach der Anlagerungsreaktion wurde nicht gebundener Ligand mit 300 µl DCC-Puffer (0,5 % Aktivkohle, 0,05 % Dextran in PMMG-Puffer) entfernt. Nach einer Zentrifugation (10 min., 4 °C) wurde der Überstand in Szintillationsgefäße überführt, mit Rotiszint (Fa. Roth, Karlsruhe) aufgefüllt und anschließend gemessen. Nach der graphischen Auswertung der Versuche konnte der IC₅₀-Wert ermittelt werden, der die halbmaximale Kompetition durch nicht radioaktiv markierten Liganden angibt.

2.11. Zellbiologische Methoden

Sämtliche Methoden lehnten sich an Protokolle an, wie sie in „*Cells; A Laboratory Manual*“ (Spector et al., 1998), „*Molecular cloning II*“ (Kapitel 6, Gorman, 1985) und „*Basic Cell Culture*“ (Davis et al., 1994) beschrieben sind.

2.11.1. Kultivierung von 10T1/2-Zellen

10T1/2 Fibroblasten (Renzikoff et al. 1973 / ATCC# CCL-226) wurden in Gewebekulturschalen (Fa. Nunclon, Roskilde, Dänemark) mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Fa. Life Technologies, Eggenstein), 100 U/ml Penicillin, 100 µg /ml Streptomycin, 20 mM Glutamin und 10 % fötalem Kälberserum (FCS; Vollmedium) bei 37 °C und 10 % CO₂ in einem feuchten Inkubator kultiviert. Exponentiell wachsende 10T1/2-Zellen wurden alle 48 Stunden bei ca. 80-90 % Konfluenz passagiert.

2.11.2. Passagierung und Kryokonservierung von Zellen

Zum Lösen der Zellen von dem Boden einer Schale mit einem Durchmesser von 10 cm wurden die Zellen mit 5 ml Hepes-Puffer gewaschen und mit 1,5 ml einer einfach konzentrierten Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA (w/v), Fa. Boehringer, Mann-

heim) behandelt. Die Zellkonzentration wurde mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und die gewünschte Zellzahl replattiert. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen trypsinisiert, in Einfriermedium (20 % FCS; 10 % DMSO in DMEM) aufgenommen (ca. 1×10^6 Zellen/ml) und jeweils 1 ml der Zellen in 1,8 ml-Kryo-Röhrchen (Fa. Nunclon, Roskilde, Dänemark) überführt. Die Zellen wurden langsam bis auf -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Rekultivierung wurden die Zellen rasch in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in Gewebekulturschalen der gewünschten Größe plattiert.

2.11.3. Transfektionen von eukaryontischen Zellen

Transiente Transfektionen von 10T1/2-Fibroblastenzellen mit Plasmid-DNA wurden mit der Calciumphosphat-Methode (Graham und van der Eb, 1973) in Anlehnung an das Protokoll aus „*Molecular Cloning II*“ (Kapitel 6; Gorman, 1985) durchgeführt. Zwei Stunden vor der transienten Transfektion wurden Zellen mit einer Konfluenz von ungefähr 50 % mit frischem Medium versorgt. Für Petrischalen mit einem Durchmesser von 6 cm wurde die Plasmid-DNA mit 750 μl 1x HBS-Puffer versetzt. Zu dieser Suspension wurde unter heftigen Vortexen 48 μl 2 M CaCl_2 tröpfchenweise dazugegeben. Dieses Präzipitat wurde nach ca. 20- 30 Minuten auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 16 h wurde das Präzipitat vorsichtig abgenommen und die Zellen in frischem Medium für 48 h weiter kultiviert. Bei Induktionsversuchen war diesem Medium 1 - 50 μM Muristerone A oder Ponasterone A (1 - 50 mM in Ethanol, Fa. Sigma; Fa. Invitrogen; frdl. Gabe von Professor Lafont) beigelegt. Nach der 48 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und gefärbt oder lysiert.

2.11.4. Fixierung der Zellen und β -Galaktosidase Assay

Zellen, die mit dem Reportergen lacZ transfiziert wurden, konnten mit X-Gal koloriert werden. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen kurz mit 1 x PBS gewaschen und mit einer 4 % igen PFA- Lösung (4 g PFA in 100 ml PBS, 15 min. unter Rühren bei 65°C erhitzen und durch Papierfilter filtrieren) für 10 min. inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen, dann mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 10 min. inkubiert und nochmals viermal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde 1ml des X-Gal Reaktionsmix (5mM $\text{KFe}(\text{CN})_6\text{II}$; 5mM $\text{KFe}(\text{CN})_6\text{III}$; 2 mM MgCl_2 in 1 x PBS, 5 % 40mg/ml X-Gal in DMSO) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C über Nacht inkubiert, bis eine Blaufärbung erschien.

2.11.5. Nachweis der Alkalischen Phosphatase in eukaryontischen Zellen

Als Transfektionsabgleich wurden die 10T1/2 Zellen mit einem pRCAS(AP) Vektor (frdl. Gabe von Prof. Dr. T. Braun) transfiziert, der die Alkalische Phosphatase (AP) exprimiert.

Nach Fixierung der Zellen (2.10.4) und dem lacZ-Assay (2.10.4) wurde die Alkalische Phosphatase Aktivität mit einem Fast Red-Assay (Fa. Boehringer Mannheim, Fa. Sigma) bestimmt. Dazu wurde eine Fast Red Tablette nach den Angaben des Herstellers in 0,1 M Tris-HCl pH8,2 gelöst und filtriert. Fast Red Tabletten enthalten ein Naphthol-Substrat, das von der AP in einen sichtbaren Farbstoff umgewandelt werden kann.

2.11.6. β -Galaktosidase Assay zur Bestimmung der qualitativen Transfektionsgüte einer Transfektion

Der β -Galaktosidase Assay lieferte einen internen Standard, um die Qualitätsunterschiede der einzelnen Transfektionen einer Versuchsreihe abzugleichen. Dazu wurde jedem DNA-Ansatz einer transienten Transfektion 5 μ g eines konstitutiv β -Galaktosidase exprimierenden Vektors (z.B. RSV-lacZ) zugesetzt. Nach Durchführung der Transfektion wurde die Enzymaktivität der β -Galaktosidase mit Hilfe des Substrates Chlorphenolrot- β -D-Galaktopyranosid (CRPG) bestimmt. Die Umsetzung dieses Substrates war photometrisch verfolgbar und proportional zur Konzentration des internen Standards. Da seine Konzentration wiederum proportional zu der Konzentration der insgesamt aufgenommenen DNA war, konnten die einzelnen Transfektionen untereinander abgeglichen werden. Dadurch war sichergestellt, daß für anschließende Versuche immer die gleiche Proteinmenge verwendet wurde.

10 μ l Proteinextrakt oder H₂O (interne Kontrolle) wurden mit 70 μ l Z-Puffer (0,06M NaH₂PO₄ x 2H₂O; 0,04 M NaH₂PO₄; 0,01M KCl; 1mM β -Mercaptoethanol) und 10 μ l 50 mM CRPG gut durchmischt. Der Ansatz wurde anschließend bei 37 °C bis zum braun-rötlichen Farbumschlag der ursprünglich gelben Lösung inkubiert. Bei guten Transfektionen trat der Farbumschlag nach ca. 2 min ein. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 900 μ l 1M Na₂CO₃ terminiert. Die optische Dichte der Suspension wurde anschließend bei 574 nm gegen den H₂O-Ansatz bestimmt.

2.11.7. Chloramphenicol-Acetyl-Transferase [CAT] Assay

Der CAT Assay stellte eine zeitsparende, sensitive und reproduzierbare Methode dar, mit der die transkriptionelle Aktivität DNA-bindender Moleküle getestet werden konnte. Dazu wurde neben der zu testenden DNA (und dem internen Standard) 5 μ g eines sog. CAT-Konstruktes auf die Zellen gegeben.

Dieses CAT-Konstrukt bestand aus einem Vektor, der das Gen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase enthält. Es war ursprünglich aus dem Transposon Tn9 isoliert worden und vermittelte eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol. Die von mir verwendeten CAT-Konstrukte enthalten eine verschieden große Anzahl von GAL4-DNA-Bindungsstellen (frdl. Gabe von T. Braun). Die Expressionrate des CAT Gens war damit von der Aktivität der Transkrip-

tionsfaktoren abhängig. Die Konzentration der Chloramphenicolacetyl-Transferase wurde mit Hilfe des radioaktiv markierten Substrat ^{14}C -Chloramphenicol gemessen. Dieses wurde durch das Enzym acetyliert. Im Anschluß an die Reaktion schloß sich eine Dünnschichtchromatographie an, die die mono- und diacetylierten ^{14}C -Chloramphenicol-Derivative von der unmodifizierten Form trennt. Die Chromatographieplatte wurde auf einem Röntgenfilm über Nacht exponiert.

Anschließend wurden die Bereiche der Chromatographieplatte, die der mono- und diacetylierten Form einerseits und der unmodifizierten Form andererseits entsprachen, ausgeschnitten und in mit Rotiszint® (Roth, Karlsruhe) gefüllte Zählröhrchen gesteckt. Im Szintillationsgerät wurde die Radioaktivität der Proben gemessen und danach graphisch ausgewertet.

Zum Abgleich der Transfektionsgüte der einzelnen Transfektionen eines Versuchs diente der β -Galaktosidase Assay (2.10.6.). Die entsprechenden Volumina der Proteinextrakte wurden in Eppendorfgefäße pipettiert und mit 0,25 M Tris-HCl, pH7,5, auf ein Volumen von 60 μl gebracht.

Zu jedem Ansatz wurden 10 μl 200mM Acetyl-Coenzym A und 2 μl ^{14}C -Chloramphenicol pipettiert. Die Lösungen wurden 1-2 Std. bei 37 °C inkubiert. Anschließend gab man 500 μl Ethylacetat zu jedem Ansatz und schüttelte die Proben für 5 min. Dabei wurden die Edukte und Produkte der ^{14}C -Chloramphenicol Acetylierung in die organische Phase extrahiert. Die Suspensionen wurden 5 min bei 13000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und in einer Lyophile (UniEquip, Martinsried) eingengt. Das Eintrocknete wurde in 15 μl Ethylacetat gelöst und anschließend auf eine Kieselgeldünnschichtplatte (Fa. Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die präparierte Platte wurde in eine Chromatographiekammer gestellt, die mit 190 ml Chloroform und 10ml Methanol gefüllt war. Die Dünnschichtchromatographie wurde 1 Std. durchgeführt. Anschließend wurde die Platte getrocknet und über Nacht exponiert.

2.11.8. Kultur von Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)

Sämtliche Methoden lehnten sich an Protokolle an, wie sie in „*Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells*“ (Robertson, 1987), „*Gene Targeting*“ (Joyner, 1993) und „*Manipulation the Mouse Embryo*“ (Hogan et al., 1994) beschrieben sind.

1981 wurden von zwei Arbeitsgruppen (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981) unabhängig voneinander pluripotente embryonale Stammzelllinien (ES Zellen) aus der „inneren Zellmasse“ (ICM) von Mausblastozysten des 129Sv Stammes isoliert. Wurden stringente Kulturbedingungen gewählt, blieb ihr entwicklungsbiologisches Potential über viele Passagen und nach genetischen Manipulationen in der Zellkultur erhalten. Von zentraler Bedeutung war da-

bei ihre Fähigkeit, an der Keimbahnentwicklung teilzunehmen (Bradley et al., 1984). So ließen sich genetische Veränderungen, die in ES Zellen eingebracht werden, in die Keimbahn von Mäusen durch die Züchtung von chimären Tieren übertragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden „knock-out“ Mäuse mittels Injektion von J1 ES-Zellen (Li et al., 1992) in Wirts-Blastozysten des Stammes C57/Bl6 generiert. J1-ES-Zellen der Passage 12 wurden freundlicherweise von Prof. T. Braun zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden zusammen mit Mitomycin C behandelten „Embryonalen Feederzellen“ auf 0,2 % Gelatine-beschichteten Kulturschalen ausgesät. Aufgrund der starken Ansäuerung durch die ES-Zellen wurde das Kulturmedium täglich gewechselt. Eine erneute Passagierung wurde, je nach Dichte der Zellen, alle 2 Tage durchgeführt. Bei regulären Passagen wurden ES-Zellen in Trypsin/EDTA/Hepes Puffer 1:5 geteilt. Vor der erneuten Plattierung wurde die Trypsinlösung durch Zentrifugation bei 1000 U/min entfernt. Bei jeder Passage wurden Stocks der ES-Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

2.11.8.1. Medien für die Kultur von ES-Zellen

500 ml ES-Zellen-Kulturmedium:	425 ml DMEM, 75 ml fötales Kälberserum (Hitze inaktiviert bei 56 °C für 30 min), 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (100 x Stock von Gibco), 5 ml Antibiotika (100 x Penicillin/Streptomycin-Stock), 4 µl β-Mercaptoethanol, optimal: +250 µl LIF [10^6 U/ml]
Einfrier-Medium (2x):	60 % DMEM, 20 % DMSO, 20 % FCS
Elektroporationspuffer:	20 mM Hepes pH7,0; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM NaH_2PO_4 , 6 mM Dextrose, 0,1 mM β-Mercaptoethanol
10.000 x FIAU:	2,5 mM in 15 mM NaOH (freundl. Gabe der Bristol-Myers Squibb Company)
G418 haltiges Medium:	0,4 mg/ml G418 haltiges ES-Zellmedium (4 mg/ml Stock in HEPES Puffer)
Gelatine Lösung:	0.2 % Gelatine in Wasser
Mitomycin C haltiges Medium:	2 mg Mitomycin C (Fa. Sigma) in 200 ml ES-

	Zellmedium
Trypsin-EDTA:	0.25 % Trypsin (2.5 % Stock; Mycoplasmen getestet, Gibco) 1 mM EDTA in HEPES Puffer, filtriert und bei -20 °C gelagert.

2.11.8.2. Die Präparation von embryonalen Fibroblasten

Zur Präparation von embryonalen Fibroblasten für die Kultivierung von ES-Zellen wurden 13,5-tägige Embryonen der β_2 -Mikroglobulin Mausmutante (Zijlstra et al., 1990) verwendet. Diese Zellen waren aufgrund der Neomycin-Kassette in beiden Allelen des β_2 -Mikroglobulin-Lokus gegenüber G418 resistent. Die Mausmutante war phänotypisch vollkommen unauffällig und eignete sich daher ausgezeichnet für diesen Zweck.

Alle folgenden Schritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Vor der Präparation der Fibroblasten wurden Kopf und Innereien der Embryonen entfernt. Das Gewebe wurde mechanisch zerkleinert und 5 min bei 37 °C in Trypsin-EDTA inkubiert. Der Verdau wurde durch die Zugabe von ES-Zellkulturmedium abgebrochen. Nach einer erneuten mechanischen Zerkleinerung und der Entfernung von groben Bestandteilen, erfolgte, nach kurzer Zentrifugation, die Plattierung der Zellen auf 25 mm Gewebekulturschalen (Nunc). Pro Embryo wurde dabei eine Schale verwendet. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Bei Bedarf wurden ein bis zwei Stock auf sechsundzwanzig 25 cm Schalen ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz 2-4 Stunden mit Mitomycin C behandelt. Mitomycin C ist ein Zytostatikum, so daß die Zellen sind nach der Behandlung nicht mehr teilungsfähig waren. Aus jeder 25 cm Schale konnten drei Stocks gewonnen werden.

2.11.8.3. Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

Die Elektroporation ist eine rein physikalische Methode zum Gentransfer. Sie basiert auf der Beobachtung, daß biologische Membranen durch die Einwirkung kurzer elektrischer Impulse oberhalb einer kritischen Feldstärke vorübergehend permeabilisiert werden, ohne daß die Membranstruktur zerstört wird. Während der Phase erhöhter Durchlässigkeit kann ein Stofftransport durch die Membran erfolgen.

Die Elektroporation von ES-Zellen wurde nach den Angaben von Thomas und Capecchi (1987) durchgeführt. Dazu wurden 8×10^7 - 1×10^8 exponentiell wachsende Zellen in einem Gesamtvolumen von 800 μ l Elektroporationspuffer und 150 μ g linearisierte und Ethanol präzipitierte DNA (in 100 μ l Elektroporationspuffer) eingesetzt. Die Suspension wurde in einer Küvette (Gene Pulser Cuvette; 0,4 cm; gap 50; Fa. BioRad) bei 25 μ F und 400V bei Raumtemperatur elektroporiert (Gene Pulser; Fa. BioRad).

Die elektroporierten Zellen wurden unverzüglich auf embryonale Feederzellen in frischem ES-Zellmedium plattiert. Aufgrund des Aufbaus des Zielkonstruktes für die ES-Zellen konnte lediglich eine Positiv-Selektion auf Neomycin-resistente ES-Zellklone durchgeführt werden (siehe auch Ergebnisteil). Die Selektion in G418 (\equiv Positiv-Selektion) begann nach 24 Stunden. Die G418-Selektion (in der Regel 0,4 mg/ml) wurde bis zur Isolierung der resistenten Klone für 9-10 Tage aufrechterhalten. Die Effizienz der Elektroporation lag gewöhnlich bei ca. einer in 10^5 Zellen.

2.11.8.4. Transiente Elektroporation von ES-Zellen mit der Cre Rekombinase

Der Zielvektor für die ES-Zellen war so konstruiert, daß er die notwendigen Elemente für eine Positiv- wie auch für eine Negativselektion innerhalb des homologen Abschnittes besaß. Deshalb konnten homolog rekombinierte ES-Zellen auch nur mit Hilfe einer positiven Selektion isoliert werden (siehe 2.10.8.3. und Ergebnisteil). Dafür eignete sich der Zielvektor jedoch für eine „hit and run“ Methode (Valancius et al., 1991; Askew et al., 1993; Wu et al., 1994), die zum Ziel hat, an Abschluß an die homologe Rekombination die DNA für die Selektionsmarker aus den ES-Zellen zu entfernen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifiziertes Protokoll aus „*Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*“ (Torres und Kühn, 1997) verwendet. Der „hit“ Abschnitt erfolgte wie in 2.10.8.3 beschrieben. Der „run“ Teil des Experimentes wurde mit Hilfe der transienten Expression eines nicht-linearisierten Cre Rekombinase Expressionsvektors durchgeführt. Dazu wurden das Neomycin-Resistenzgen und das Thymidin Kinase Gen des Zielvektors mit *loxP* Sequenzen, das sind die Sequenzabschnitte für die Cre vermittelte Rekombination, flankiert.

1×10^7 ES-Zellen einer homolog rekombinierten ES-Zellkolonie wurden dazu in 800 μ l Elektroporationspuffer aufgenommen und mit 30 μ g eines nicht-linearisierten Cre Expressionsplasmids vermengt. Die Elektroporation fand unter Standardbedingungen statt. Anschließend wurden die Zellen auf mit embryonalen Feederzellen versehenen Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte eine Negativ-Selektion mit 1 x FIAU. Nur solche Zellen, die eine Rekombination zwischen den *loxP* Sequenzen erfahren hatten, überstanden die Selektion. Nach ca. 10 Tagen konnten die Klone gepickt, passagiert und kryokonserviert (2.11.8.5.) werden.

2.11.8.5. Isolierung von ES-Zellklonen und deren Kryokonservierung

ES-Zellklone wurden lichtmikroskopisch identifiziert. Resistente Klone wurden nach einer G418-Selektion von 9-10 Tagen isoliert. Dazu wurden die Kulturen einmal in Hepes-Puffer gewaschen und mit 10 ml Hepes-Puffer überschichtet. Klone wurden mechanisch von den

umgebenden Embryonalen Feederzellen getrennt und bei Raumtemperatur in 50 µl 1 x Trypsin in Hepes/EDTA auf 96-Loch-Platten (Nunc) dissoziiert. Der enzymatische Verdau wurde nach 10-15 min durch die Zugabe von ES-Zellmedium und einer adäquaten Menge an embryonalen Fibroblasten beendet. Die Zellen wurden nach dem Isolieren bei 37 °C kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Klone mit Hilfe von 1 x Trypsin in Hepes/EDTA dissoziiert.

1/5 der Zellen wurden zum Zwecke der DNA-Isolierung auf 24-Loch-Schalen (Nunc) in ES-Zellmedium überführt. Diese Zellen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz ohne erneuten Mediumwechsel kultiviert. Die DNA-Isolierung schloß sich nach dem Umschlag des Phenolrot-Indikators nach Gelb an, der die Ansäuerung des Mediums durch ES-Zellen anzeigt.

4/5 der Zellen (40 µl Gesamtvolumen) wurden nach Zugabe von 40 µl 2 x Einfriermedium (20 % DMSO; 20 % FCS in Hepes-gepuffertem DMEM) mit Paraffinöl (Sigma) überschichtet. Die Zellkulturschale wurde mit Parafilm verschlossen und die Zellen unverzüglich bei -80 °C eingefroren. Um die Zellen nicht durch einen schnellen Flüssigkeitsverlust zu schädigen, wurden diese langsam, in einem größerem Behälter eingefroren. Die Klone wurden bis nach der DNA-Analyse bei -80 °C gelagert. Rekombinante Klone wurden nach Auftauen bei 37 °C in 10 ml ES-Zellmedium gegeben, zentrifugiert und auf 24-Loch-Schalen (Nunc) in der Gegenwart von embryonalen Feederzellen kultiviert. Aus je einem Drittel der konfluenten Zellen wurden zwei Stocks gebildet und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Ein Drittel der Zellen wurde auf 6 cm Zellkulturschalen (Nunc) bis zur Konfluenz kultiviert. Aus diesen Zellen wurden drei Stocks zum Zwecke der Blastozysteninjektion gebildet. Die zu injizierenden Zellen wurden etwa 5 Tage vor der Injektion auf 6 Loch Kulturschalen ausgesät.

2.11.9. Blastozysten-Injektion von ES-Zellen

2.11.9.1. Isolierung von Blastozysten

Blastozysten der Inzuchtstämme C57/Bl6 und ICR wurden, wie bei Hogan et al.(1994) beschrieben, am Tag 3,5 isoliert. Der Zeitpunkt der Befruchtung ließ sich leicht an dem Zurückbleiben eines vaginalen Pfropfs am Morgen nach der Verpaarung sondieren. Bei diesem Pfropfen handelt es sich um Reste der Spermienflüssigkeit, die nach einigen Stunden resorbiert werden. Der Zeitpunkt des vaginalen Pfropfs wird definitionsgemäß als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung angesehen. Es wurden lediglich natürliche Verpaarungen angesetzt. Weibliche Mäuse durchlaufen den Ovulationszyklus etwa alle 5 Tage. Übereinstimmend damit wies am Tag nach der Verpaarung eines von ca. 5 Weibchen einen vaginalen Pfropfen auf. Verpaart wurde jeweils ein Männchen mit drei Weibchen. Das genaue Vorgehen der Isolierung von Blastozysten wurde von Hogan et al.(1994) beschrieben. Aus den Stämmen wurden im Schnitt etwa 5-9 injizierbare Blastozysten pro Maus isoliert.

Blastozysten wurden bis zur Injektion von ES-Zellen bei 37 °C und 10 % CO₂ im Brutschrank gelagert. Zur Erhaltung des pH-Wertes wurden die Blastozysten in stark Hepes-gepuffertem Medium (Transfer-Medium: 50 % ES-Zellmedium; 50 % Hepes-Puffer) gehalten und mit sterilem Paraffinöl (Dimethoxypolysiloxan (Fa.Sigma)) überschichtet.

2.11.9.2. Superovulation von Mäusen

Gonadotropin-Gaben an fertile Mäuseweibchen konnten die Anzahl der ovulierten Eizellen sehr stark erhöhen (bis zu Faktor 5, Hogan et al., 1994). Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurden Weibchen des ICR Stammes superovuliert. Zwei Gonadotropine wurden verwendet: Dabei wurde *Pregnant Mare's Serum* (PMS) als Ersatz für das follikelstimulierende Hormon (FSH) und menschliches Choriongonadotropin (hCG) als Ersatz für das Luteinisierungshormon (LH) verwendet. Jeweils 5 IU wurden intraperitoneal injiziert, um eine schnelle Aufnahme in den Blutkreislauf der Maus zu gewährleisten. Zwischen der PMS Injektion und der hCG Injektion wurde ein 46- 48 h Interval geschoben. 10-13 Stunden nach der hCG Injektion erfolgte die Superovulation. Am Abend davor wurde jeweils ein injiziertes ICR-Weibchen zu einem ICR-Männchen gesetzt. Am nächsten Morgen wurde die Verpaarung anhand des Vaginalpfropfens überprüft.

2.11.9.3. Injektion von ES-Zellen

Injektions- und Haltekapillaren (GC-100-10; GB-100-10; BioLogic, Frankfurt) wurden mit einer Mikroschmiede (Bachhofer) nach den Angaben von Hogan et al. (1994) hergestellt. ES-Zellen der jüngsten verfügbaren Passage wurden am Tag der Injektion ohne embryonale Feederzellen auf eine eine Nummer größere, mit Gelatine-beschichtete Zellkulturschale für ca. 30 min. ausgesät. In dieser Zeit setzten sich die Feederzellen auf der Schale ab, während sich die ES-Zellen noch in Suspension befanden. Der Überstand wurde abzentrifugiert, und die ES-Zellen in Präparationsmedium aufgenommen. Zur Stabilisierung des pH-Wertes und zum Schutz vor Kontaminationen wurden die Zellen mit Mineralöl überschichtet. Die Blastozysteninjektion schloß sich unverzüglich daran an und wurde wie in Hogan et al. (1994) beschrieben durchgeführt. Während der Injektion wurden die Zellen auf eine Temperatur von etwa 10 °C gekühlt. Nach der Manipulation wurden die Blastozysten noch etwa eine Stunde bei 37 °C und 10 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Daran schloß sich unmittelbar der Embryo-Transfer an.

2.11.10. Embryo-Transfer in pseudoträchtige Mäuse

Pseudoträchtige Weibchen des Stammes B6D2F1 wurden durch die Verpaarung mit vasektomierten ICR-Männchen gewonnen. Nach dieser Verpaarung, die anhand eines Vagi-

nalpfropfens am Tag E0,5 festgestellt wurde, wurden die Reproduktionstrakte des Weibchens hormonell auf die Aufnahme von befruchteten Eizellen vorbereitet. Ein pseudoträchtiges Weibchen würde nach nicht erfolgter Implantation von befruchteten Eizellen erst nach etwa 11 Tagen wieder in den normalen Zyklus kommen. Für den Blastozysten-Transfer wurden pseudoträchtige Weibchen am Tag 2,5 oder 3,5 verwendet. Der Embryo-Transfer wurde wie in Hogan et al.(1994) beschrieben durchgeführt.

Anästhetika: Avertin (Hogan et al., 1994)

Eine Stocklösung von 100 % Avertin wurde durch die Mischung von 10 g 2,2,2-Tribromoethyl Alkohol (Fa. Sigma-Aldrich) mit tert-amyl-Alkohol (Fa. Sigma-Aldrich) angesetzt. Für die Benutzung wurde eine 2,5%-ige Lösung mit H₂O verdünnt. Beide Stocklösungen wurden bei 4 °C in Dunkelheit gelagert. Für die Anästhesie wurden 0,015 ml/g Körpergewicht eingesetzt.

2.11.11. Identifizierung von Chimären

Chimären wurden anhand des Agouti-Fellmarkers identifiziert. Männliche Mäuse mit einem Chimärismus von mindestens 70 % wurden auf den Ausgangsstamm zurückgekreuzt. Agouti-farbene Nachkommen wurden im Alter von 3 Wochen in einer Southern-Analyse genotypisiert.

3. Ergebnisse

3.1. Generierung und Testung eines transkriptionell und posttranslational regulierbaren eukaryontischen Expressionssystems zur Steuerung der Cre Rekombinase

3.1.1. Strategie

Voraussetzung für die konditionelle Funktionsanalyse eines Genprodukts *in vivo* ist die Entwicklung von Steuerungsmechanismen, die innerhalb eines definierten Zeitrahmens zur Ausschaltung einer Genfunktion in einem definierten Gewebe führen. Dem Steuerungsapparat, der die Ausschaltung der Genfunktion überwacht, kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu. Er muß so konzipiert sein, daß er im abgeschalteten Zustand inaktiv ist, so daß es zu keiner Einschränkung der zu untersuchenden Genfunktion kommt. Nach seiner Aktivierung muß er innerhalb einer kurzen Zeitspanne verläßlich und räumlich gleichmäßig seine Funktion erfüllen.

Der zentrale Baustein des untersuchten Steuerungsmechanismus ist die sequenzspezifische Cre Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 (Austin et al., 1981). Die Cre Rekombinase ist per se ein konstitutiv aktives Enzym. Sie mit einem „Schalter“ zu versehen, der ihre Aktivität *in vitro* und *in vivo* steuert, ist daher von zentraler Bedeutung.

Hierzu sind prinzipiell zwei verschiedene Strategien denkbar:

Die erste zielt auf die transkriptionelle Kontrolle der Cre Rekombinase. In eukaryontischen Expressionssystemen werden hierfür entweder gewebespezifische Promotoren oder Enhancer, die mit basalen, oftmals viralen Transkriptionseinheiten, gekoppelt sind, verwendet. Diese führen zu einem gewebespezifischen Expressionsmuster der Cre Rekombinase. Des weiteren lassen sich induzierbare Promotoren verwenden, die z.B. mit dem Tetrazyklin Repressor kontrolliert werden können (Gossen und Bujard, 1992). Eine weitere Strategie basiert auf der Expression des Ecdyson-Rezeptors in Säugetierzellen. Im Prinzip induziert die Bindung des Liganden Muriesterone A die nukleäre Translokation, wo der Rezeptor-Komplex an seinen spezifischen Promotor binden kann (No et al., 1996). Dieses Transaktivatorsystem ist der Ausgangspunkt für die transkriptionelle Kontrolle der Cre Rekombinase in der vorliegenden Arbeit (No et al., 1996). In der Schnittmenge der Expressionsmuster der Cre Rekombinase und des Zielgens kommt es zu einer homologen Rekombination, die eine Genverlust-Genanalyse ermöglicht (z.B. Gu et al., 1994).

Die zweite Strategie zielt auf die posttranslationale Kontrolle des exprimierten Cre Rekombinase Proteins. In diesem Falle wird ein Fusionsprodukt aus der Cre Rekombinase und einer

sterischen Inhibitionsdomäne exprimiert. Das Hybridprotein hat keine Funktion, da das aktive Zentrum des Enzyms durch die Konformation der Inhibitiordomäne maskiert ist. Durch die Bindung eines Induktors wird die Konformation der Domäne so verändert, daß die Inhibition unterbunden wird. Als Konsequenz ist das Cre-Hybrid nun aktiv und kann an seine Erkennungssequenzen anlagern und eine Rekombination durchführen. Proteindomänen, die effizient enzymatisch aktive Proteinzentren ligandenabhängig inhibieren können, finden sich in den Hormonbindungsdomänen (HBD) von Steroid-Rezeptoren (Picard, 1994). Bisher wurden vor allem Fusionen aus der Cre Rekombinase und der Östrogen-Rezeptor HBD hergestellt und funktionell getestet (z.B. Brocard et al., 1997). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte HBD stammt aus dem Ecdyson-Rezeptor aus *D. melanogaster* (Koelle et al., 1991). Sie hat den Vorteil, aus einem völlig anderem Tierstamm zu kommen, über Wechselwirkungen mit endogenen Säugetier-Liganden ist nichts bekannt. Cre-Ecdyson-Rezeptor HBD Fusionen sollten sich spezifisch durch die Bindung der Liganden Ecdyson oder Muristerone A aktivieren lassen.

Die Cre Rekombinase stellt ein sehr aktives Enzym dar. Schon wenige Moleküle des Enzyms pro Zelle reichen aus, um eine loxP vermittelte Rekombination einzuleiten (Buckingham, Metzler, persönliche Kommunikation; eigene Ergebnisse). Die Gefahr einer vorzeitigen, aberanten Cre Aktivierung ist sehr groß.

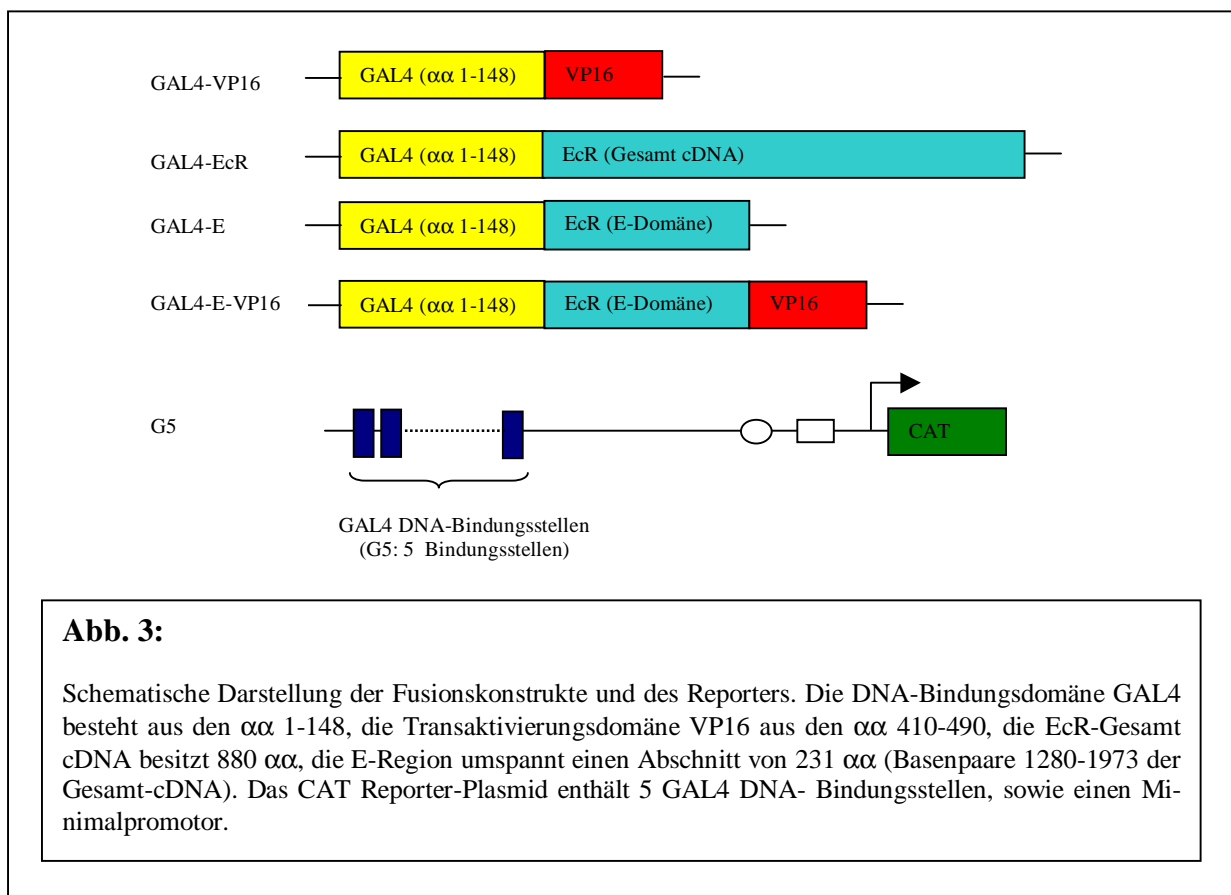
Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollte daher die Möglichkeit überprüft werden, beide Strategien miteinander zu verknüpfen, um eine verlässlichere Kontrolle der Cre Rekombinase zu erzielen. Um das System dennoch universell und verlässlich einsetzen zu können, wurden die transkriptionellen und posttranslationalen Kontrollelemente so gewählt, daß sie von demselben Signal, nämlich dem Liganden Muristerone A aktiviert werden konnten. So war die Aktivierung der Cre Rekombinase nur von einem Signal abhängig, obwohl zwei unabhängige Steuerelemente regulierend wirkten.

3.1.2. Regulation der Aktivität der GAL4 Transaktivatorordomäne durch eine Fusion mit dem Ecdyson-Rezeptor: Generierung der Hybridmoleküle

Zunächst wurde getestet, ob der Ecdyson-Rezeptor überhaupt in der Lage ist, in einem heterologen System als Bestandteil einer Fusion mit einem modellhaften Transaktivator dessen Aktivität posttranslational zu regulieren. Als Transaktivator diente das gut charakterisierte GAL4 Transaktivatorsystem aus der Hefe *S. cerevisiae*. Die Fusionen bestanden aus der GAL4 DNA Bindungsdomäne, die die Aminosäuren 1-148 umspannte (Laughon und Gesteland, 1984), und verschiedenen Fragmenten aus der Ecdyson-Rezeptor cDNA (im folgenden mit EcR bezeichnet; Koelle et al., 1991). Getestet wurde zum einen die Transaktivierungsfähigkeit und Induzierbarkeit der gesamten EcR-cDNA, zum anderen eines Teils der cDNA, der lediglich die Hormonbindungsdomäne oder E-Domäne des Rezeptors umfaßte. In einem weiteren Kon-

strukt wurde die aminoternale Transaktivierungsdomäne des Ecdyson-Rezeptors gegen die entsprechende Domäne des Herpes Simplex Virus Proteins VP16 (Triezenberg et al., 1988) ausgetauscht. Durch die Fusion der E-Domäne mit GAL4-VP16 konnte daher der Einfluß dieser Domäne auf den völlig heterologen Transaktivator GAL4-VP16 untersucht werden. Als Kontrolle diente das konstitutiv aktive Konstrukt GAL4-VP16. Die DNA-Bindungsdomäne von GAL4 enthielt ein Kernlokalisierungssignal und in Verbindung mit VP16 entstand der außerordentlich starke Transaktivator GAL4-VP16, der konstitutiv als Homodimer wirksam war (Sadowski et al., 1988; Emami und Carey et al., 1989).

Die verschiedenen Fusionskonstrukte sind in Abb. 3 schematisch dargestellt. Detaillierte Angaben über Plasmide und Oligonukleotid Sequenzen, die für die Klonierungsschritte verwendet wurden, sind dem Material und Methoden Teil dieser Arbeit zu entnehmen. Sämtliche Fusionskonstrukte wurden in Expressionsvektoren mit einem SV40 Minimal-Promotor kloniert.



3.1.2.1. Test der GAL4-EcR-Hybride im CAT-Assay

3.1.2.1.1. GAL4-E-VP16 ist durch das Ecdyson-Derivat Muristerone A induzierbar: Die Induktion ist in Abwesenheit von USP nachweisbar.

Anschließend wurden die Fusionen transient in der Fibroblasten-Zelllinie 10T1/2 (Reznikoff et al., 1973) exprimiert und getestet. Die Zellen wurden dazu zunächst in Normalmedium kulti-

viert (siehe unten). Zur Bestimmung der Transaktivierungsstärken der einzelnen Fusionen wurden Chloramphenicol-Transferase (CAT) Assays durchgeführt. Als Reporter diente ein Chloramphenicol-Acetyl-Transferase Expressionsvektor (G5), der von 5 GAL4 DNA-Bindungssequenzen gesteuert wurde (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Herrn Prof. T. Braun). Der Abgleich der Transfektionen erfolgte mit Hilfe eines quantitativen LacZ-Assays. Dazu wurde 5 µg des Vektors pRSV-LacZ zu jedem Transfektionsansatz co-transfiziert.

In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) konnte gezeigt werden, daß GAL4-VP16 um ein Vielfaches aktiver als die anderen Konstrukte ist. Daher wurde 50 x weniger GAL4-VP16 (10 ng pro Transfektion) für die transienten Transfektionen eingesetzt als für die anderen Aktivatoren (jeweils 500 ng pro Transfektion). Zunächst wurden zwei verschiedene Muristerone-Konzentrationen (1 µM; 10 µM) verwendet, um die Induktion zu überprüfen.

Die einzelnen Transaktivatorfusionen verhielten sich dabei höchst unterschiedlich (Abb. 4). GAL4-VP16 war erwartungsgemäß konstitutiv aktiv. Im Gegensatz zu den mit GAL4-VP16 erzielten Ergebnissen konnten mit GAL4-E und GAL4-EcR unter den getesteten Transfektionsbedingungen (Abb. 4, 5, Daten nicht gezeigt) keine Transaktivierung erzielt werden. Im Falle von GAL4-E war das auf das Fehlen einer Transaktivierungsdomäne in der E-Domäne zurückzuführen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete E-Domäne enthielt eine kleine N-terminale Deletion, die sie lediglich zur Interaktion mit dem Liganden befähigte. Die DNA-Bindungs- bzw. Transaktivierungseigenschaften waren verloren (siehe auch Diskussion). Einen Nachweis, daß die in dieser Studie verwendete E-Domäne für die Interaktion mit dem Hormonliganden prinzipiell ausreichend war, wurde in einem anderem Zusammenhang erbracht (3.1.3.2.).

Die fehlende Aktivität von GAL4-EcR war hingegen überraschend, enthielt das Konstrukt doch die Gesamt-cDNA des Ecdyson-Rezeptors, die gut dokumentierte Transaktivierungsdomänen enthielt. Allerdings waren für den Ecdyson-Rezeptor nicht nur aktivierende, sondern auch inhibierende (sterisch-behindernde) Domänen charakterisiert worden, die die Konformation des Hybridproteins in der Art und Weise verändern konnten, daß ein vollständig inaktives und inertes Fusionsmolekül entstand (siehe Diskussion).

Interessant war hingegen die Aktivierung des CAT-Reporters durch GAL4-E-VP16. Die Insertion der E-Domäne in das GAL4-VP16 Molekül bewirkte eine ungefähr 300 fache Abnahme in der Basalaktivität (10 ng GAL4-VP16: 0,076 zu 500 ng GAL4-E-VP16: 0,013; Abb. 4a). D.h., die Insertion der relativ kleinen Ecdyson-Bindungsdomäne in ein heterogenes Molekül führte zu einer Konformationsänderung, die extrem inhibierend auf die Aktivität des Fusionsmoleküls wirkte. Die Zugabe von Muristerone A führte zu einer spezifischen Aktivierung von GAL4-E-VP16. Dabei wurde in Abwesenheit von USP schon bei einer Konzentration von 1 µM Muristerone A eine 9 fache Aktivitätssteigerung von GAL4-E-VP16 (Abb. 4A: von 0,013 auf 0,119) erreicht.

Der funktionelle Ecdyson-Rezeptor besteht *in vivo* aus einem Heterodimer, der aus EcR und dem Co-Aktivator Ultraspiracle (im folgenden mit USP abgekürzt) besteht (Yao et al., 1992;

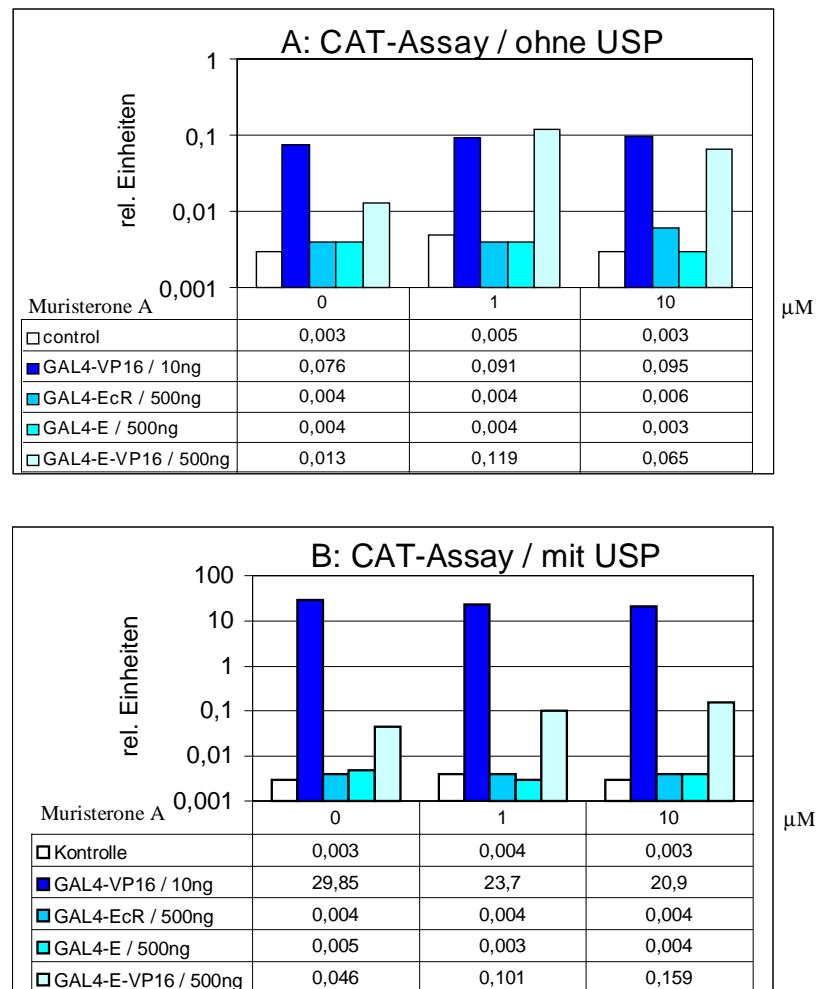


Abb. 4:

Die E-Domäne aus dem Ecdyson-Rezeptor war in Säugetierzellen funktionell und konnte die Aktivität eines heterologen Transaktivators posttranslational regulieren. Gezeigt sind die Resultate von CAT-Assay aus Zellextrakten transfizierter 10T1/2 Zellen. Als Reporter diente G5 (jeweils 1 µg/Transfektion (tf)). Jede Transfektion wurde mindestens dreimal durchgeführt, gezeigt ist eine repräsentative.

(A): In Normalmedium erhöhte sich die Transaktivierungsrate des Konstrukts GAL4-E-VP16 nach Zugabe von 1 µM Muristerone A um den Faktor 9. Die Aktivierung erfolgte ohne exogen hinzugegebenen Co-Aktivator. Höhere Konzentrationen von Muristerone A bewirkten keine weitere Aktivitätssteigerungen der Fusion. GAL4-E und GAL4-EcR waren dagegen inaktiv. (B): USP bewirkte eine Verstärkung der Basalaktivität der Konstrukte. Die Aktivierung durch Muristerone A fiel dadurch relativ schwächer aus. GAL4-E und GAL4-EcR waren wiederum inaktiv. In (A) und (B) war das Konstrukt GAL4-VP16 konstitutiv aktiv, seine Aktivität wurde aber indirekt von der Co-Transfektion von USP beeinflusst. (Kontrolle: pKS)

Yao et al., 1993; Thomas et al., 1993). Die Heterodimerisierung ist notwendig und hinreichend für die Ligandenbindung und Transaktivierung des nativen Steroid-Rezeptors. Um zu

testen, ob USP auch unter den gegebenen Bedingungen einen Einfluß auf die Transaktivität der Ecdyson-Rezeptor Fusionen besitzt, wurden die Transfektionen unter Zugabe von 1µg USP pro Transfektion wiederholt (Abb. 4b).

Die Fusionsproteine GAL4-E und GAL4-EcR besaßen sich auch in Anwesenheit von USP und dem Induktor Muristerone A keine Transaktivierungsfähigkeit (Abb. 4b). Entweder hatten die entsprechenden Fusionen ihre Fähigkeit zur Heterodimerisierung verloren, oder waren auch nach einer Heterodimerisierung mit USP in der Säugerzelllinie 10T1/2 inaktiv. USP verhielt sich aber nicht inert, sondern beeinflusste die allgemeine transkriptionelle Aktivierung in den transfizierten Zellen. Die Aktivität des konstitutiv aktiven Kontrollproteins GAL4-VP16 nahm in erheblichem und signifikantem Maße durch die Zugabe von USP zu. Dieser Effekt war unabhängig von Hormongaben. Da GAL4-VP16 keine Heterodimerisierungsdomäne für eine Interaktion mit USP besaß, konnte diese Aktivierung nicht auf einen direkten Effekt des Hormonrezeptors auf den Transaktivator zurückgeführt werden.

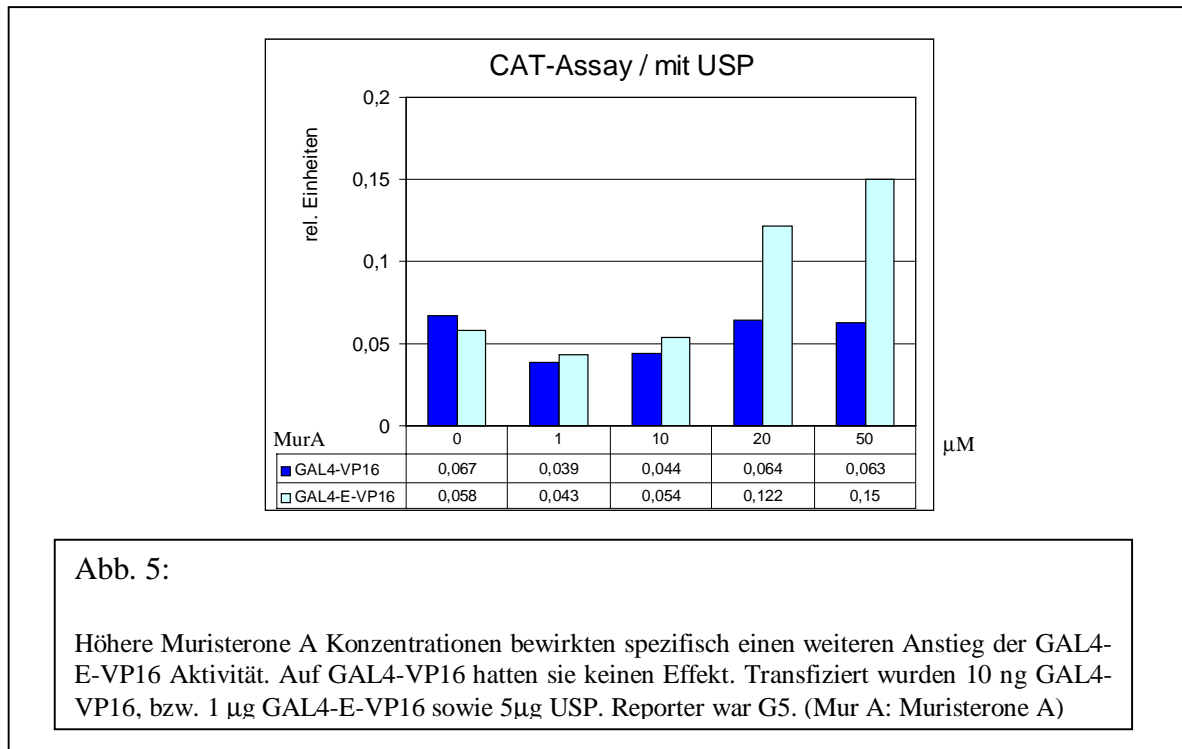
Das Konstrukt GAL4-E-VP16 ließ sich hingegen auch in Anwesenheit von USP nach Zugabe von Muristerone A aktivieren (Abb. 4b). Allerdings war seine Basalaktivität um den Faktor 3,5 erhöht (0,046 im Vergleich zu 0,013 ohne USP). Die Aktivität nach Zugabe von Muristerone A war ungefähr vergleichbar mit der Aktivität, die ohne USP-Zugabe erzielt wurde. (Abb. 4b: 0,101), allerdings verminderte sich die Induktionsrate aufgrund der höheren Basalaktivität auf den Faktor 2,2. Im direkten Vergleich mit dem Kontrollkonstrukt GAL4-VP16 war die Fusion GAL4-E-VP16 vor der Zugabe von Muristerone A jedoch um den Faktor 650 weniger aktiv, nach Zugabe von 10 µM Muristerone A war die Fusion „nur“ noch 131 Mal weniger aktiv. Daher fiel die relative Induktion um den Faktor 4,9 auch doppelt so hoch aus wie die absolute Induktion. Der Frage, ob höhere Muristerone A Gaben daher noch einen weiteren Anstieg der Aktivität von GAL4-E-VP16 bewirken konnten, wurde daher gesondert nachgegangen (nächster Abschnitt).

Als Fazit läßt sich festhalten, dass bestimmte Domänen (hier die HBD) des nukleären Rezeptors für Ecdyson aus *Drosophila* in einem heterologen Säugetiersystem funktionell sind, wenn man sie aus ihrem ursprünglichen Molekül herauslöst und mit anderen Proteinen fusioniert. Die Funktionalität der in dieser Studie verwendeten E-Domäne beschränkt sich aber nur auf wenige Eigenschaften der ursprünglichen Domäne in ihrem Wildtyp-Kontext:

Die Ligandenbindung der E-Domäne war unverändert (siehe Abschnitt 3.1.3.2.). Durch die Fusion mit einem funktionellem Transaktivator war eine posttranslationale Regulation dieses Transaktivators in Abhängigkeit von exogen hinzugegebenem Liganden möglich. Allerdings besaß die in dieser Untersuchung verwendete E-Domäne keine eigene Transaktivierungsfähigkeit mehr und schien auch nicht mehr zu heterodimerisieren.

3.1.2.1.2. Einfluß der Muristerone A Konzentration auf die Transaktivierung von GAL4-E-VP16

Im Anschluß an die vorherigen Analysen wurde untersucht, ob höhere Muristerone A Konzentrationen einen Effekt auf die Transaktivator-Leistung von GAL4-E-VP16 ausübten. Insgesamt wurden Muristerone A Konzentrationen von 1 μM bis 50 μM getestet (Abb.5).



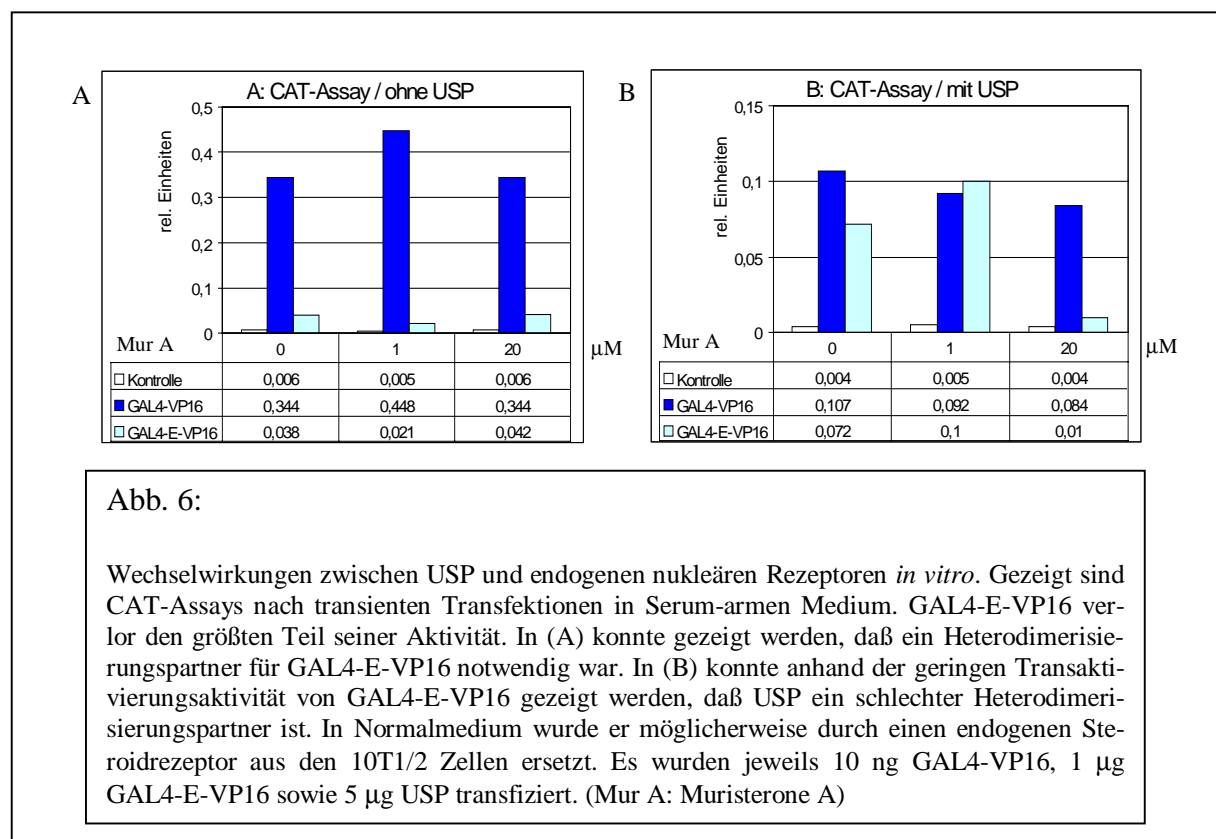
Innerhalb dieses Konzentrationsbereichs konnte kein negativer Effekt von Muristerone A auf GAL4-E-VP16 oder auf GAL4-VP16 nachgewiesen werden. Im Gegenteil, höhere Muristerone A Gaben in Gegenwart von USP bewirkten sogar noch einen weiteren Aktivitätsanstieg von GAL4-E-VP16 (Abb.5). Selbst bei einer Konzentration von 50 μM Muristerone A schien noch kein Konzentrationsoptimum erreicht zu sein. Die Aktivität von GAL4-VP16 war dagegen konstitutiv und über den gesamten Muristerone A Konzentrationsbereich konstant.

3.1.2.1.3. Transaktivierungen im Serum-armen Medium

Die Basalaktivität nach Co-Transfektion des Co-Rezeptors USP nahm unter den untersuchten Bedingungen stets zu. Die Vorteile einer Co-Transfektion durch USP waren infolge vieler nicht überprüfbarer Nebenwirkungen, die dieser Hormonrezeptor in der Maus-Zelllinie auslöste, wieder zunichte gemacht. Als mögliche Erklärung konnte der Umstand dienen, daß in den Versuchen zunächst Normalmedium verwendet wurde, das einen relativ hohen Serumgehalt besaß. Steroidhormone aus dem Medium bewirkten dabei möglicherweise eine Aktivierung von USP, der dann mit anderen endogenen Steroidrezeptoren der Maus-Zelllinie wechselwir-

ken konnte. Dabei mag die allgemeine Transkriptionsrate in den Zellen erheblich angestiegen sein, was sich indirekt in einer verstärkten Transaktivierung durch GAL4-VP16 auswirken konnte. Interessanterweise diente USP vor allem deshalb lange Zeit als Heterodimerisierungspartner der Wahl, weil er als aus *Drosophila melanogaster* stammendes Molekül vermeidlich inert sein sollte.

Um diese schwer nachzuweisenden Wechselwirkungen zwischen endogenen und exogen hinzugefügten nukleären Rezeptoren zu überprüfen, wurden die Transfektionen abschließend in Serum-armen Medium wiederholt. Die 10T1/2 Zellen wurden dazu in DMEM-Medium ohne Phenolrot, das mit 10 % Horse-Serum versetzt war, kultiviert, um den Hormonspiegel so gering wie möglich zu halten (Berthois et al., 1986). Die Transfektionen wurden wiederum mit und ohne USP durchgeführt (Abb. 6).



Wie aus Abb. 6 entnommen werden kann, spielte das Kulturmedium in den 10T1/2 Zellen eine große Rolle. Die hohen Transaktivierungsraten von GAL4-E-VP16 in Abwesenheit von USP konnten nur erzielt werden, weil er durch einen anderen endogenen Steroidrezeptor aus den 10T1/2 Zellen ersetzt wurde. Über die Natur dieses Rezeptors kann nur spekuliert werden. Möglicherweise stammt er aus der Familie der RXR-Rezeptoren (Mangeldorf und Evans; 1995). Diese gehen *in vitro* eine sehr starke Interaktion mit dem EcR ein und sind dabei ein besserer Dimerisierungspartner als USP (Thomas et al., 1993). USP scheint kein sehr guter Dimerisierungspartner in Wachstumsfaktor-armen Medium zu sein. Abb. 6 (B) zeigt, daß der Zusatz von 5 µg USP pro Transfektionsansatz nur bedingt aktivierend wirkt (Stei-

gerung um 30 %). Bei höheren Muristerone A-Konzentrationen (20 μ M) wirkt USP sogar inhibierend auf die Gesamtaktivität.

3.1.3. Generierung und funktioneller Test von Cre-EcR Hybriden in einem heterologen Transkriptionssystem

Nachdem im Abschnitt 3.1.2. gezeigt werden konnte, daß die in dieser Arbeit verwendete E-Domäne des Ecdyson-Rezeptors die Aktivität eines heterologen Moleküls von Ligandgaben abhängig machen konnte, stand sie als molekularbiologisches Werkzeug zu Verfügung, um die Aktivität anderer Enzyme zu kontrollieren. Daher wurde sie für die Generierung verschiedener Fusionen mit der Cre Rekombinase eingesetzt, wie in Abschnitt 3.1.1. erläutert wurde. Die Fusionen wurden anschließend in einem transienten Transfektionssystem in einer Säugerzelllinie getestet. Als Induktor diente wiederum das Ecdyson-Derivat Muristerone A.

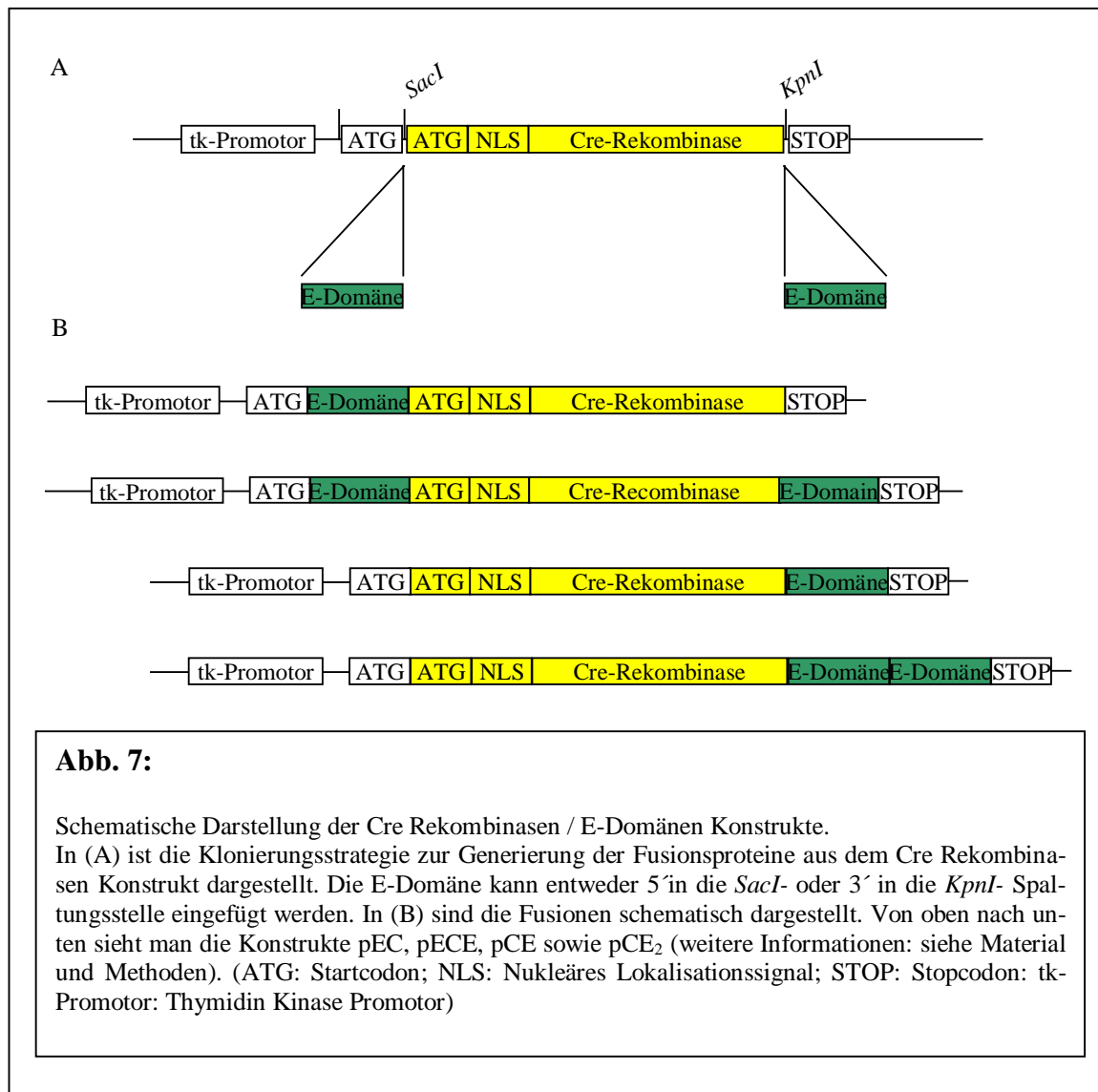
3.1.3.1. Generierung von Hybridmolekülen aus der Cre Rekombinase und der E-Domäne des Ecdyson-Rezeptor

Aus den vorangegangenen Versuchen ging u.a. nicht klar hervor, wo die optimale Position für die E-Domäne innerhalb eines Fusionsproteins lag. Deshalb wurden eine Reihe von Cre-E-Domänen-Fusionen hergestellt, die sich in der Lage und Anzahl der E-Domäne unterscheiden (Abb. 7). Die verwendete Cre Rekombinase stammte aus dem Vektor pMC1.12, der sich vom Vektor pMC-Cre ableitete (Gu et al., 1993). Die verwendete E-Domäne wurde mit spezifischen Primern durch PCR amplifiziert und subkloniert (siehe Material und Methoden). Anschließend wurden die folgenden vier Konstrukte hergestellt:

pEC, pECE; pCE sowie pCE₂. Dabei steht „C“ für die Cre-Rekombinase und „E“ für die E-Domäne; die Schreibweise gibt wieder, in welcher Reihenfolge die einzelnen Elemente ligiert wurden (Abb. 7).

3.1.3.2. Die Cre-E-Domänen Fusionen binden ihren Liganden

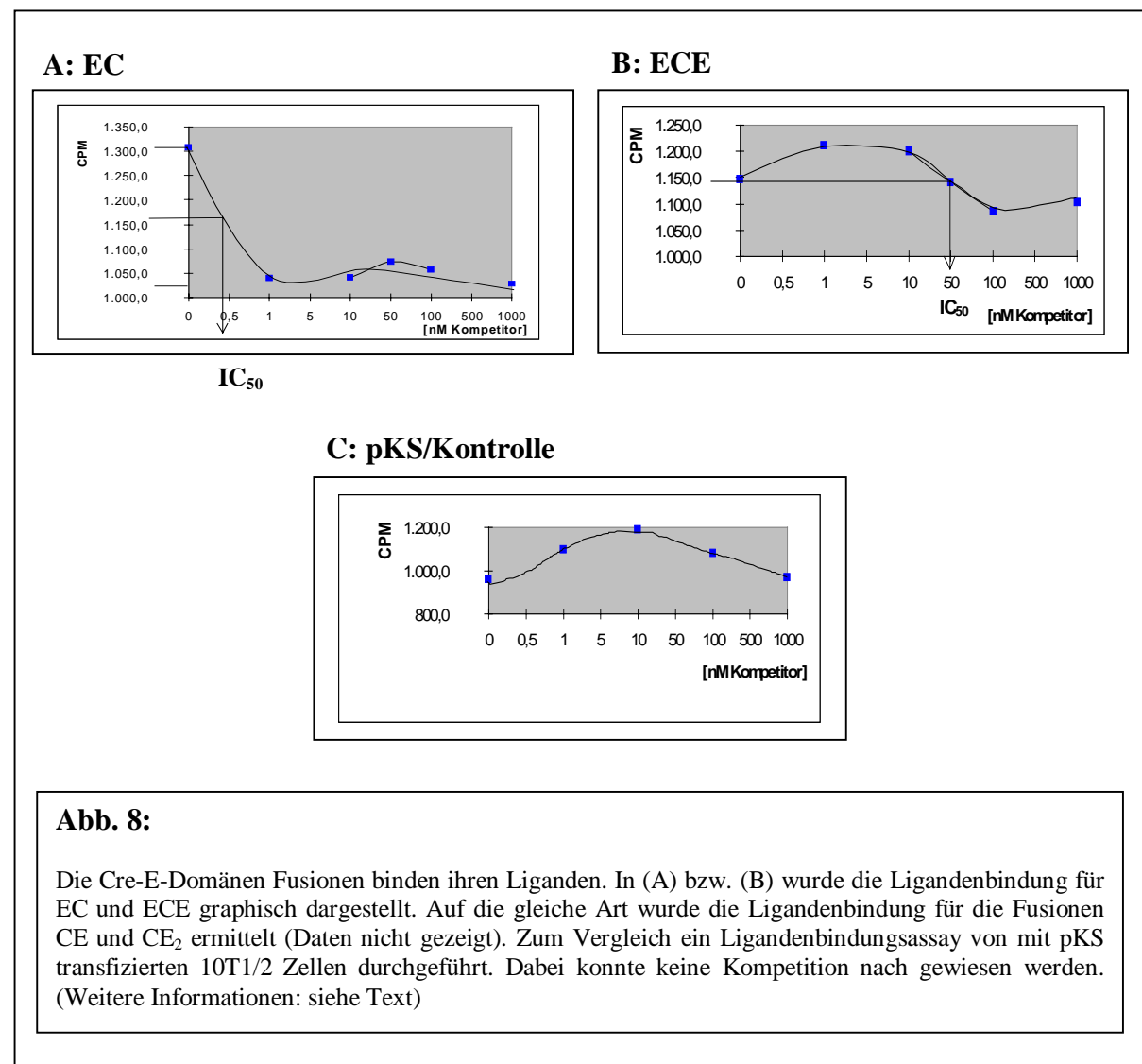
Anschließend gelang mit einem Kompetitions-Assay der Nachweis, daß die Hybridmoleküle pEC; pECE; pCE sowie pCE₂ den Ecdyson-Rezeptor Liganden Muristerone A banden. Die Kompetitions-Assays wurden mit normalisierten Proteinextrakten aus transient transfizierten 10T1/2 Zellen durchgeführt. Als Kompetitor diente unmarkiertes Muristerone A, das zur Verdrängung von radioaktiv markiertem Ponasterone A aus dem Ligand-Rezeptor-Komplex eingesetzt wurde. Die Abnahme des radioaktiv markierten Liganden in Relation zur eingesetzten Kompetitormenge wurde in Szintillationszähler gemessen. Die Aktivierung des Ecdyson-Rezeptors durch den Liganden Ponasterone A ist dokumentiert (Christopherson et al., 1992) und



wurde im Rahmen dieser Arbeit für das verwendete Testsystem nachgewiesen (3.1.6.). Damit wurde ein wichtiger Beweis dafür erbracht, daß die beobachteten Induktionen nach dem exogenen Zusatz des Liganden das Resultat einer spezifischen Rezeptor-Ligand Interaktion war.

Die graphische Auswertung der Kompetitionsassays ermöglichte die Ermittlung des IC₅₀-Wertes, der die halbmaximale Kompetition durch nicht radioaktiv markierten Liganden anzeigt. Der IC₅₀-Wert gibt Aufschluß über die Höhe der Affinität der Rezeptor-Fusionen zu den spezifischen Liganden Muristerone A und Ponasterone A: Je niedriger der IC₅₀-Wert ist, desto höher ist die Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden. Die Ergebnisse wurden, wie für pEC und pECE exemplarisch in Abb. 8 dargestellt, graphisch ausgewertet. Die ermittelten IC₅₀-Werte für diese wie die übrigen Konstrukte sind in Tabelle 1 angegeben. Sie zeigen, daß die Hybridmoleküle aus der Cre Rekombinase und der modifizierten E-Domäne die Liganden Muristerone A und Ponasterone A banden, wenngleich in unterschiedlichem Ausmaße. 10T1/2 Zellen, die mit der Kontrolle pKS transfiziert wurden, hatten hingegen keine Affinität zu dem radioaktiv markierten Liganden.

Dieses Ergebnis stellte einen weiteren Hinweis dafür dar, daß die E-Domäne aus dem Ecdyson-Rezeptor funktionell autonom vom Rest des Moleküls war und für die Bindung zum Liganden nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend war. Allerdings waren die Affinitäten der einzelnen Cre-Fusionen sehr unterschiedlich zu ihren Liganden. Dabei spielte offenkundig die Positionierung der E-Domäne eine entscheidende Rolle. Befand sich die E-Domäne am aminoterminalen Ende der Fusion, war die Affinität sehr viel höher, als wenn sie sich carboxyterminal befand (Abb. 8; Tab. 1). In den folgenden Abschnitten wird gezeigt, daß sich die unterschiedlichen Affinitäten zu den getesteten Ecdyson-Rezeptor Liganden in dem Ausmaß der Induzierbarkeit widerspiegeln (Abb.11).



3.1.3.3. Test der Cre-E-Domänen Fusionen in transienten Transfektionen

Die Cre-E-Domänen-Fusionen wurden in transienten Transfektionen in 10T1/2 Zellen getestet. Als Reporter diente pPac1 [pPGKpaX1], ein β -Galaktosidase Expressionskonstrukt (Abb.

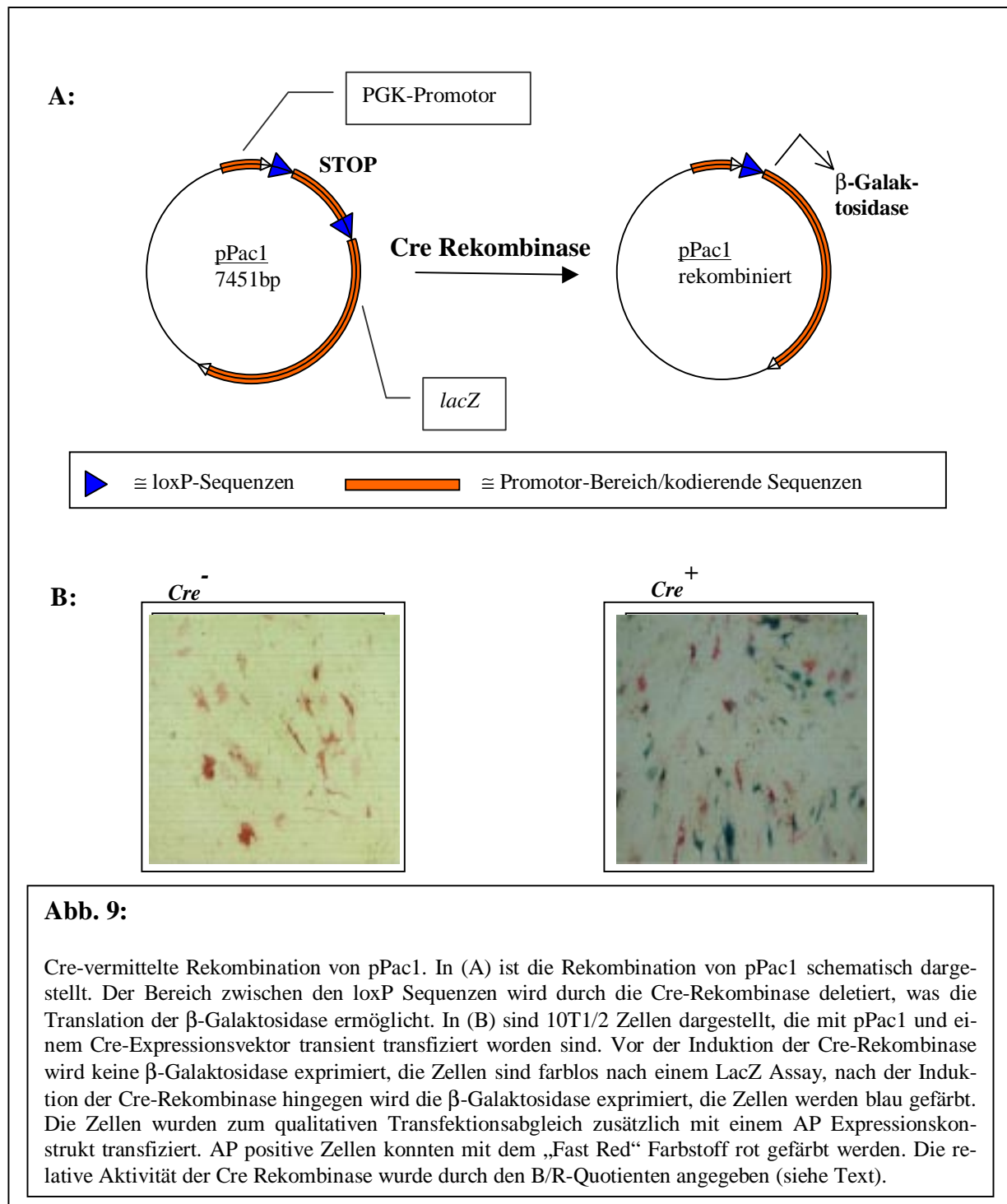
9) unter der Kontrolle des PGK-Promotors (Kellendonk et al., 1996). In dem unrekombinier-ten Zustand verhinderte ein von loxP Sequenzen flankierter („gefloxter“) 5'Abschnitt mit Stopkodons die Translation der β -Galaktosidase.

Tabelle 1: IC ₅₀ -Werte für die Cre-E-Domänen Hybride	
Konstrukt	IC₅₀-Wert
EC	0,4 nM
CE	20 nM
CE ₂	20 nM
ECE	55 nM
Die IC ₅₀ -Werte wurden aus den Messungen des Kompetitionstests abgeleitet.	

Die Cre-vermittelte Rekombination führte zu einer Deletion dieses DNA-Segmentes, so daß die β -Galaktosidase unter Kontrolle des PGK-Promotors translatiert werden konnte. Zellen, in denen eine Cre-Aktivität vorlag, konnten nach Abschluß des Versuchszeitraums fixiert werden und mit Hilfe von IPTG und X-Gal gefärbt werden. Zellen mit einer aktiven Cre Rekombinase wurden auf diese Weise blau angefärbt. Die Qualität der Transfektionen wurde durch Co-Transfektion eines die menschliche Alkalische Phosphatase (AP) codierenden Expressionskonstruktes überprüft. Die Verwendung des „Fast Red“ Farbstoffes ermöglichte die gleichzeitige Darstellung von Zellen mit AP und lacZ Aktivität, so daß ein genauer Abgleich der Transfektionseffizienz möglich wurde. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch durch das Auszählen dreier zufällig ausgewählter Quadrate von 2,5 mm² Grundfläche. Die relative Cre-Aktivität wurde anschließend durch den sogenannten B/R-Quotienten, der den Mittelwert dreier Zählungen der Quotienten aus blauen und roten Zellen darstellte, angegeben.

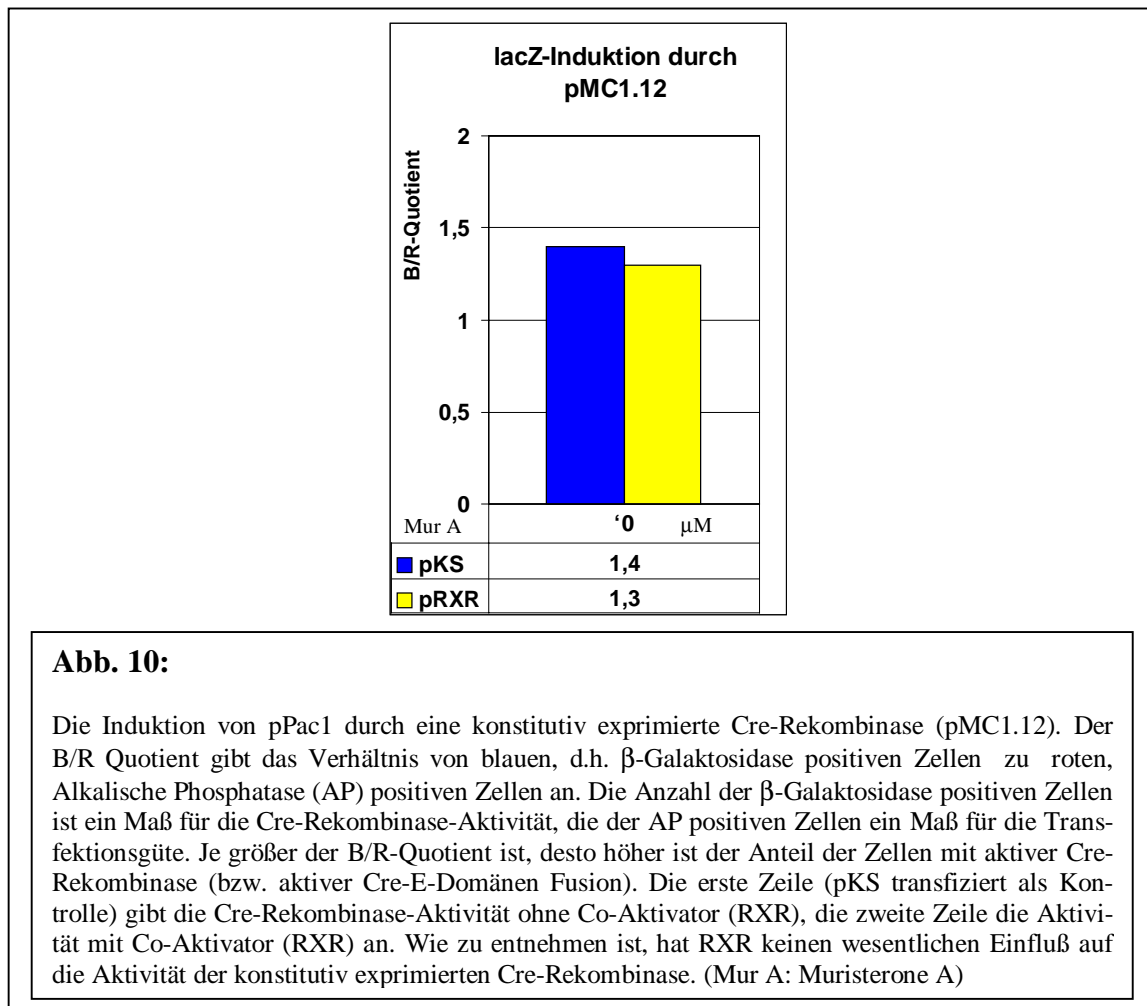
Als weitere Kontrolle wurden in einem parallelem Transfektionsansatz eine gleich große Menge an 10T1/2 Zellen mit einem CMVnlsLacZ Konstrukt transfiziert. Dieses Konstrukt bewirkte eine konstitutive, kernständige Expression der β -Galaktosidase und gab einen An-

haltspunkt über die Qualität der Transfektion. Im allgemeinen wurde eine Transfektionsrate von ca. 50% erzielt, was im oberen Bereich der zu erwarteten Transfektionsgüte unter transienten Versuchsbedingungen lag.

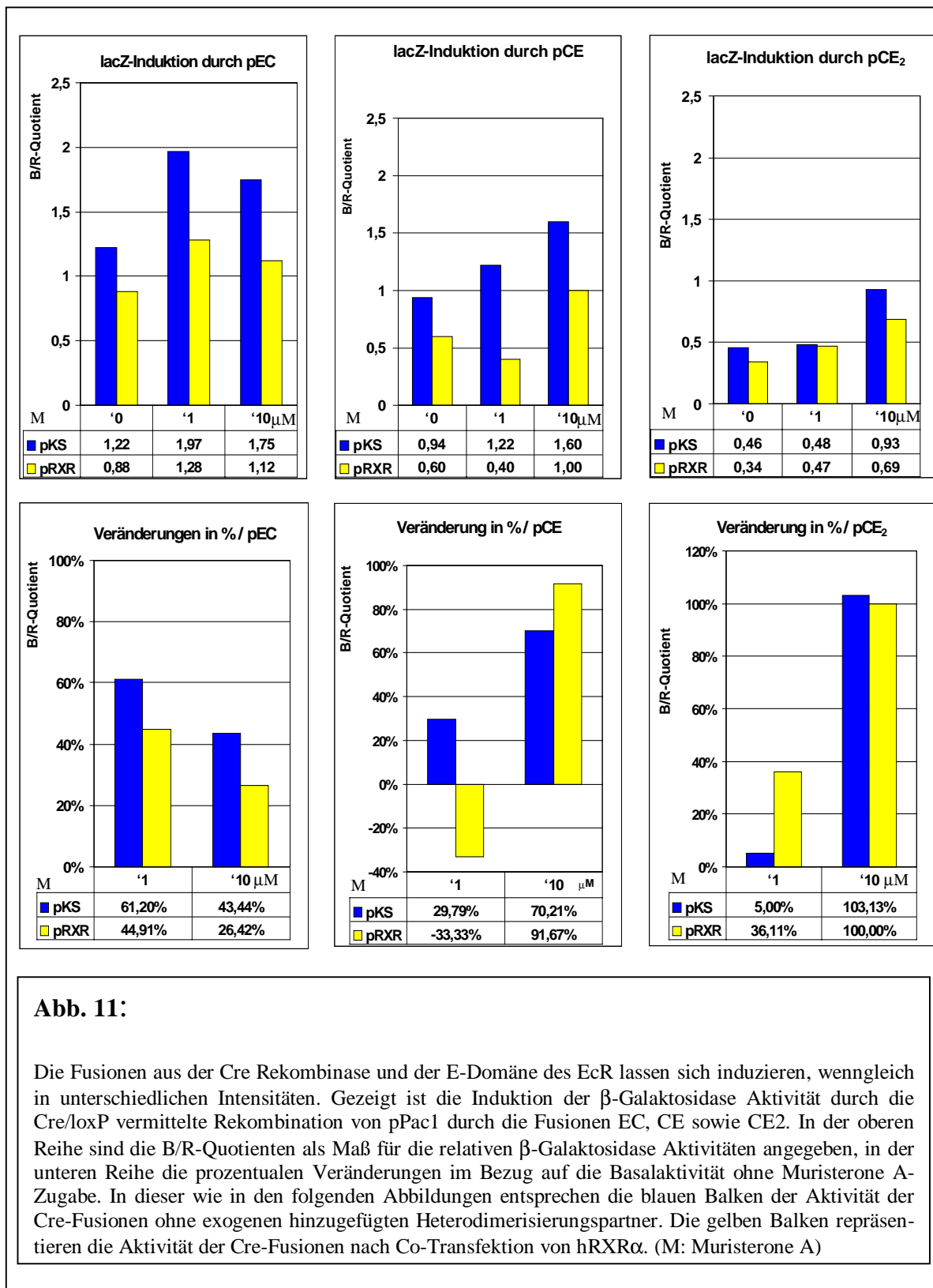


Die Konstrukte pEC, pCE, pCE₂ und pECE wurden in dem oben beschriebenen Testsystem mehrfach (pEC: sechs-; pCE: fünf-; pCE₂: sieben-; pECE: viermal) getestet. Als Kontrolle diente das Plasmid pMC1.12, das die Cre Rekombinase konstitutiv exprimierte. Wie in Abb. 10 gezeigt wird, wies die Cre Rekombinase erwartungsgemäß eine konstitutive Aktivität auf.

Wie aus der Abb.11 zu entnehmen ist, ließen sich die Konstrukte pEC, pCE und pCE₂ induzieren, wenngleich in unterschiedlichem Ausmaße. Die Induktion war dabei sowohl von



der Anzahl der E-Domänen als auch von ihrer Position abhängig. Die Konzentration des Induktors Muristerone A war ebenfalls von Bedeutung. Befand sich die E-Domäne am aminoterminalen Ende der Cre Rekombinase (EC), fand eine deutliche Induktion bei geringen Muristerone A Konzentrationen (1 μ M) statt. Bei höheren Muristerone Konzentrationen (10 μ M) fiel die Induktion weniger hoch aus. Fusionen mit carboxyterminaler E-Domäne (CE und CE₂) wurden bevorzugt bei höheren Muristerone A Konzentrationen induziert. Dafür war die Basalaktivität von CE und CE₂ in Abwesenheit eines Induktors um ein Viertel (CE) bzw. um zwei Drittel (CE₂) geringer als bei EC (Abb. 11). Mit den beiden carboxyterminalen E-Domänen-Fusionen konnten daher auch höhere Induktionsraten erzielt werden. Allerdings war ihr Induktionslevel viel niedriger als der von EC. Im Falle von CE₂ war z.B. die maximale Aktivität der Cre-Fusion halb so groß wie die von EC. Wurde die Cre Rekombinase jedoch von zwei E-Domänen amino- und carboxyterminal flankiert wie im Falle der Fusion ECE, verlor sie ihre Aktivität vollständig (Daten nicht gezeigt). Dieses war wahrscheinlich auf einen Zustand sterischer Inhibition zurückzuführen, dem sich eine so fusionierte Cre Rekombinase



binase ausgesetzt sah. ECE Fusionen konnten sich vermutlich nicht mehr zu dem für ihre Funktion essentiellen tetramerschen Komplex an ihrer loxP Zielsequenz anlagern. Die erzielten Ergebnisse befinden sich im Einklang mit den Resultaten der Lingandenbindungs-Kompetitionsassays (3.1.3.2.). Je höher die Affinitäten zu den Ecdyson-Rezeptor Liganden

Muristerone A und Ponasterone A waren, desto niedriger war die zur Maximal-Induktion notwendige Menge an Liganden.

Beim Vergleich der Höhen der Cre-Fusionen Aktivitäten stellte man eine signifikante Variabilität von Versuch zu Versuch fest, was sich in recht großen Werten für die Standardabweichung ausdrückte (Daten nicht gezeigt). Diese Streuung war möglicherweise auf das subtile Gleichgewicht zwischen „schon“ aktiver Cre-Fusion und noch nicht umgesetztem (rekombiniertem) Reportergen zurückzuführen. Die verhältnismäßig geringe Anzahl der Messungen ließ darüber hinaus eine Angabe der Standardabweichung als nicht sinnvoll erscheinen. Scheinbar war der Zustand von inaktiven und vollständig rekombiniertem pPac1 Reportergen von nur sehr wenigen aktiven Cre Molekülen mehr oder weniger abhängig. Denn der Zustand einer β -Galaktosidase positiven Zelle war letztendlich Produkt einer Signalamplifikation. Nach Überschreiten eines gewissen Schwellenwertes wurden sämtliche Reportergene Cre/loxP vermittelt rekombiniert. Eine weitere Induktion der Cre Rekombinase über diesen Schwellenwert hinaus war mit dem verwendeten Testsystem, das auf einer Alles-oder-Nichts Reaktion beruhte, nicht nachweisbar (siehe Diskussion).

Als Fazit ließ sich aber festhalten, daß sich Cre-Fusionsproteine mit einer E-Domäne induzieren ließen, wenngleich die Position der E-Domäne einen großen Einfluß auf die Hintergrundaktivität und die Induktionsrate hatte. Die große Streuung der erzielten Ergebnisse machte deutlich, daß weitere Kontrollelemente notwendig waren, um die Cre Aktivität verläßlich zu steuern.

3.1.3.4. Der Einfluß verschiedener Konzentrationen des EcR Heterodimerisierungspartners hRXR α auf die Transaktivierungsrate der Cre-Fusionen

In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise, daß der Ecdyson-Rezeptor für seine Aktivierung nicht nur mit seinem Liganden interagieren muß, sondern zusätzlich noch einen Partner benötigt, mit dem er heterodimerisiert (Yao et al., 1992; 1993; Thomas et al., 1993).

Um den Einfluß eines Heterodimerisierungspartners auf die verwandten Konstrukte zu testen, wurden Transfektionen mit und ohne hRXR α , dem humanen Vertebratenhomolog des nativen Co-Rezeptors USP (Oro et al., 1990), durchgeführt. Die Fusionen ließen sich auch ohne exogen zugeführten Heterodimerisierungspartner hRXR α induzieren. Erstaunlicherweise schien der Zusatz von exogen hinzugefügtem hRXR α sogar inhibierend auf die Transaktivierung der Cre-E-Domänen Fusionen zu sein. Im Falle von CE resultierte die Zugabe von geringen Konzentrationen Muristerone A sogar in eine Netto-Inhibition bei Anwesenheit von RXR (minus 33 %, Abb. 10). Allerdings wurden die Experimente unter hohen Wachstumsfaktorkonzentrationen durchgeführt, so daß eine Substitution von USP/ hRXR α durch einen endogenen Stero-

idrezeptor wahrscheinlich ist. Ein derartiges Phänomen wurde bereits unter 3.1.2.1.3. beschrieben.

Die Gesamtkonzentration des Heterodimerisierungspartners RXR schien daher doch einen gewissen Einfluß auf die Cre-Fusionen Aktivität zu haben..

In den zunächst durchgeführten Versuchen waren die Konzentrationen der Cre-E-Domänen Fusionen und die des Co-Rezeptors RXR (bzw. der Kontrolle pKS) gleichbleibend. Es wurden jeweils 0,25 µg/Ansatz an Rekombinase und 0,5 µg/Ansatz hRXRα transfiziert. Um zu testen, ob geringere Konzentrationen an exogen zugefügten hRXRα ebenfalls inhibierend auf die Rekombinationsraten der Cre-Fusionen wirkten, wurde eine Eichkurve mit der Cre-Fusion CE₂ durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Mengen an hRXRα (0,0625 µg bis 0,5 µg) bei konstanter Menge an CE₂ (0,25 µg) eingesetzt.

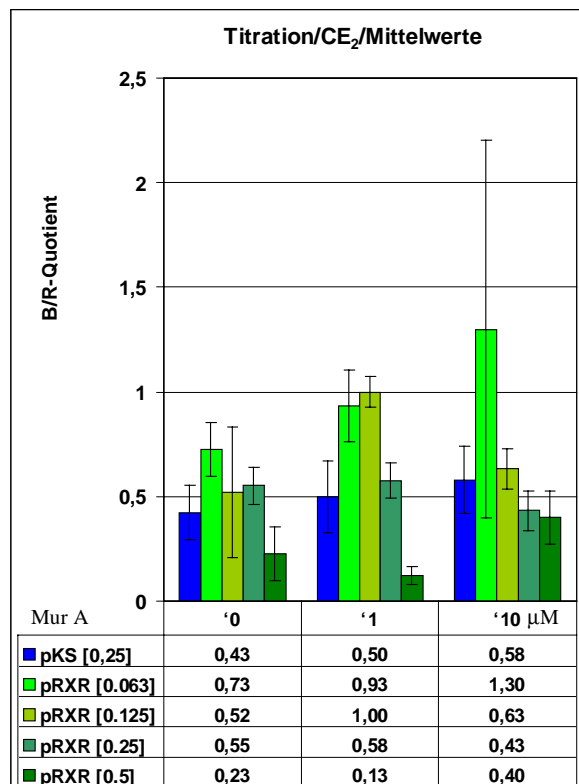


Abb. 12:

Steigende Konzentrationen von hRXRα wirken inhibierend auf die Cre Rekombinase Aktivität in der Fusion CE₂: Titration des Co-Rezeptors hRXRα bei gleichbleibender CE₂ Konzentration (0,25 µg/tf). Die RXR-Konzentrationen und die der Kontrolle (pKS) sind in µg/tf angegeben. Geringe RXR-Konzentrationen wirken stimulierend auf die Rekombinasen-Aktivität nach Zugabe des Induktors Muristerone A. RXR-Konzentrationen von 0,25 µg/tf und mehr wirken sich negativ auf die Aktivität der Rekombinasen-Fusion aus. Sehr hohe RXR Konzentrationen reduzieren die Hintergrundaktivität, so daß Muristerone A wieder aktivierend wirkt. Der Abbildung liegen 4 unabhängige Testreihen zugrunde. (tf: Transfektionsansatz; Mur A: Muristerone A)

Das Ergebnis ist in Abb. 12 dargestellt. Dabei zeigte sich, daß geringere hRXR α -Konzentrationen nicht inhibierend, sondern aktivierend auf die Gesamtaktivität der Rekombinase-Fusion wirkten. Die optimale Aktivierung der Cre-E-Domänen Fusionen wurde bei einer Konzentration von ca. 0,0625 μ g/ Transfektionsansatz beobachtet. Das entsprach einer Konzentration von 1,25 pg hRXR α /Zelle, wenn man voraussetzte, daß ca. 50000 Zellen pro Kulturschale transfiziert wurden. Der Zusatz dieser Menge an RXR ließ die Basalaktivität um ca. 70 % ansteigen (0,43 auf 0,73), die Induktion betrug ca. 80 %. Damit wurde gezeigt, daß die Konzentration der in dem Wachstumsfaktorreichen Medium vorhandenen Steroidrezeptoren noch nicht das Optimum für die Co-Rezeptor Konzentration darstellten. Wurden jedoch höhere hRXR α -Konzentration gewählt, fiel die induzierte Cre Aktivität entsprechend geringer aus. Bei der Standardkonzentration von 0,25 μ g/10⁶ Zellen hRXR α konnte schließlich keine Induktion mehr beobachtet werden. Nichts desto trotz wirkte Muristerone A induzierend in Gegenwart von sehr hohen hRXR α Werten, da durch die hRXR α -Konzentration die Hintergrundaktivität der Cre Rekombinase entscheidend vermindert wurde. Sie betrug bei der höchsten getesteten hRXR α -Konzentration (0,5 μ g) nur noch ca. 30 % der Aktivität, die bei der geringsten hRXR α -Konzentration erzielt wurde (0,0625 μ g; 1,3 zu 0,4).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß hRXR α in den eingesetzten Mengen keine Verstärkung der Cre Rekombinasen-Aktivität bewirkte. Erst bei hohen RXR-Konzentrationen wurde die Basalaktivität reduziert, so daß nun Induktionen sichtbar wurden. Sicherlich wird die Wahl der optimalen RXR-Konzentration davon abhängen, ob die primäre Zielsetzung eines Cre vermittelten Rekombinationsereignisses das Erreichen der höchsten Induktionsrate oder geringsten Hintergrundaktivität darstellt (siehe Diskussion).

3.1.4. Transkriptionelle Kontrolle der Cre Rekombinase mit dem Ecdyson-Rezeptor

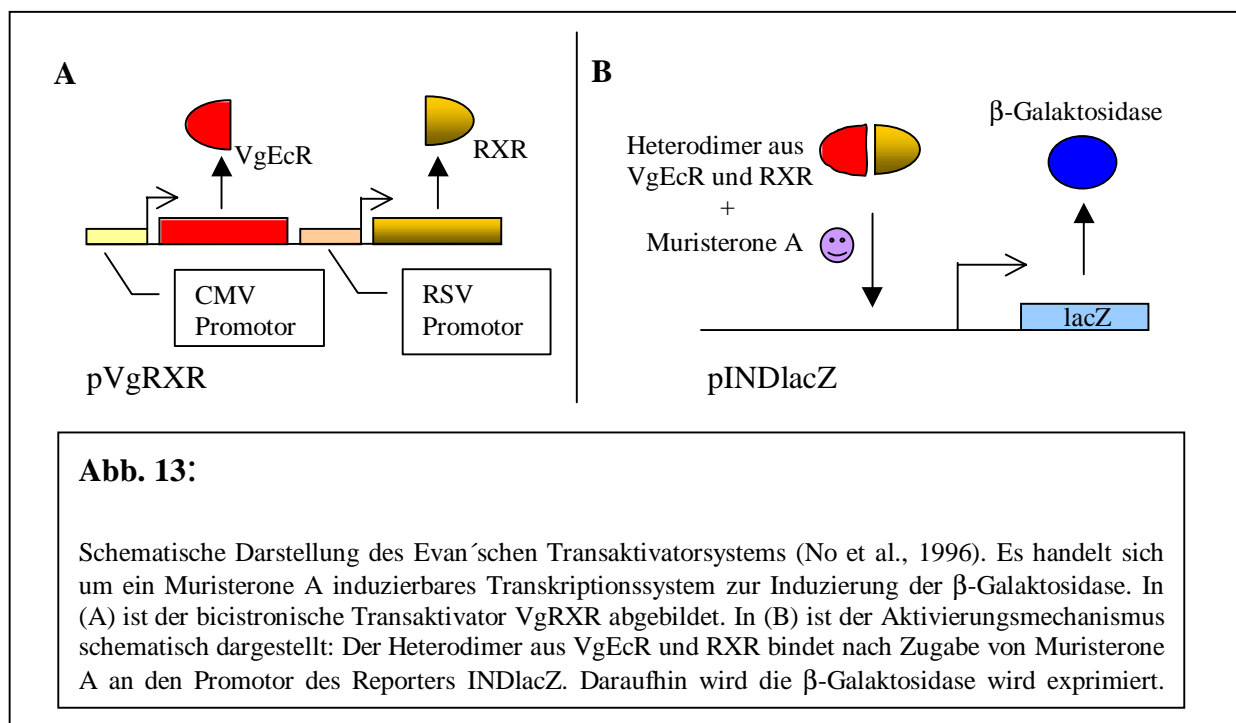
In dem vorangegangenen Abschnitt wurde ein System zur Steuerung der Cre Rekombinase etabliert, das mit dem Ecdyson-Rezeptor auf ein posttranslationales Kontrollelement zurückgriff. In diesem Abschnitt werden die Resultate der Entwicklung eines transkriptionellen Kontrollsystems dargestellt, das die Expression der Cre Rekombinase steuert.

Die in dieser Arbeit verfolgte Strategie zur transkriptionellen Kontrolle basiert auf einem induzierbaren Promotorsystem. Zur Aktivierung des Zielgens wird dabei exogen ein Induktor zu den Zellen gegeben bzw. oder ultimativ der Maus verabreicht, ohne Nebenwirkungen hervorzurufen. Das von mir gewählte System wurde in Grundzügen in dem Laboratorium von Prof. R. Evans entwickelt (No et al., 1996) und ist mittlerweile kommerziell erhältlich (Invitrogen, Leek; NL). Der zentrale Bestandteil dieses Systems basiert ebenfalls auf dem Ecdyson-Rezeptor. Hier fungiert er jedoch als induzierbarer, transkriptioneller Transaktivator und aktiviert entsprechende Promotorkonstrukte, die mit den spezifischen Ecdyson-respon-

siven Zielsequenzen ausgestattet sind. Als Induktoren wirken die Ecdyson-Derivate Muristerone A oder Ponasterone A (diese Arbeit).

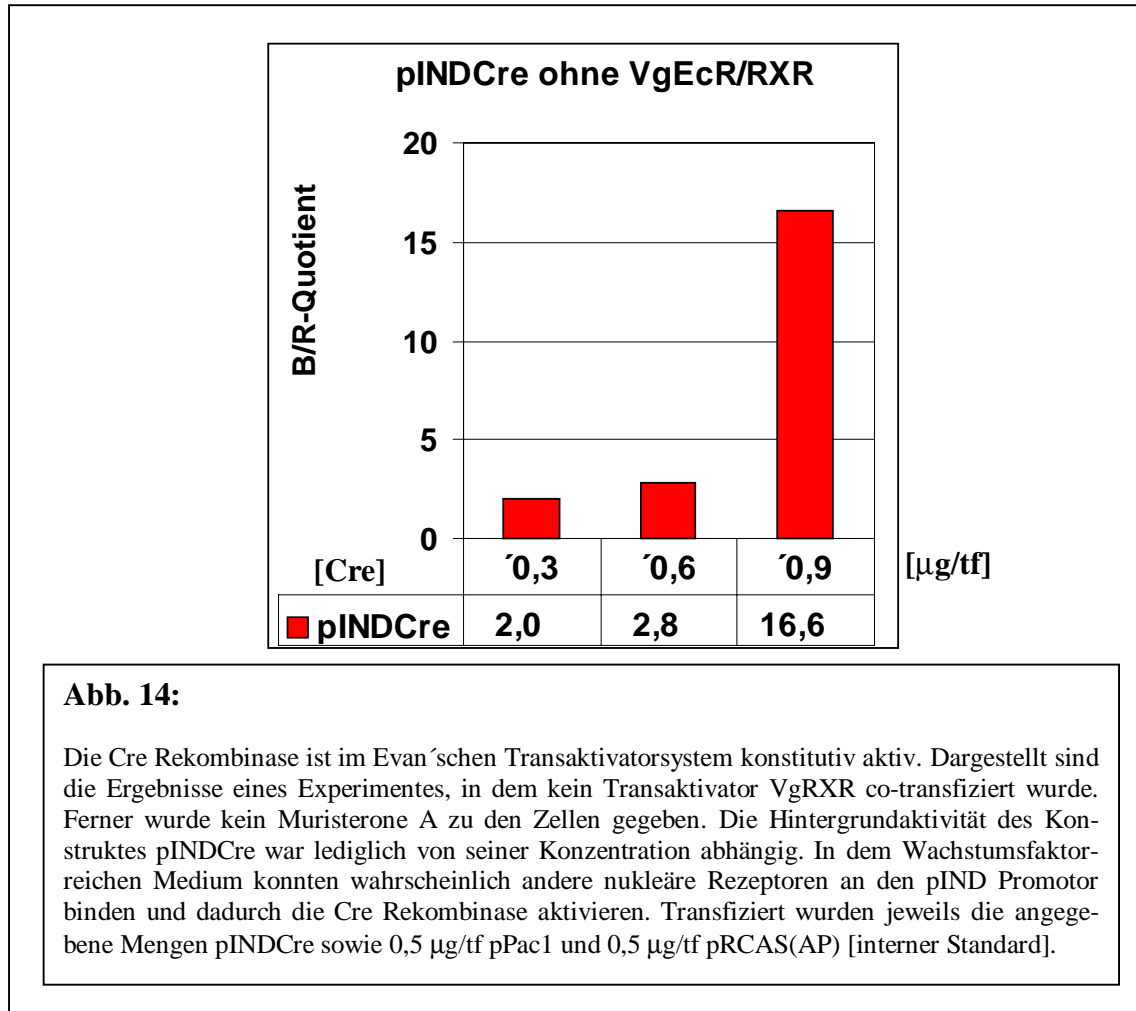
3.1.4.1. Das Evan'sche Transaktivator-System erlaubt keine Induktion der Cre Rekombinase

Das von No et al. (No et al., 1996) beschriebene System (Abb.13) basiert auf einem zweiteiligen Transaktivatorsystem, das aus einem bicistronischem Expressionsvektor und einem Reporter gen besteht. Der zentrale Mechanismus beruht wiederum auf eine Interaktion des Ecdyson-Rezeptors aus *Drosophila melanogaster* mit seinem spezifischen Liganden Muristerone A. Der Rezeptor wurde durch eine Fusion mit der Herpes Simplex Virus VP16 Aktivierungsdomäne modifiziert, um in Säugetierzellen als transkriptioneller Aktivator VgEcR wirksam zu sein. Ferner wurde seine DNA-Bindungsdomäne leicht modifiziert, um Kreuzreaktionen mit endogenen Steroid-responsiven Promotoren der Maus auszuschließen. Der bicistronische Expressionsvektor kodierte ferner für den Heterodimerisierungspartner RXR, der in vorangegangenen Teilen der Doktorarbeit beschrieben wurde.



Der durch die exogene Zugabe von Muristerone A ausgelöste Aktivierungsmechanismus sah eine Heterodimerisierung mit anschließender DNA-Bindung der beiden Transaktivatoren vor. Als DNA-Bindungsstellen dienten fünf modifizierte Ecdyson-responsive-Elemente (E/GREs), die sich oberhalb eines minimalen Hitzeschock-Promotors befanden. In der originalen Publikation diente als Reporter die β-Galaktosidase (pINDlacZ), allerdings können in der strangabwärts gelegenen multiplen Klonierungsstelle des Expressionsvektors pIND beliebige cDNAs inseriert werden. Diese Möglichkeit wurde genutzt, um die cDNA der Cre Rekombinase in

den Vektor pIND zu klonieren. Das entstandene Konstrukt wurde pINDCre genannt. Anschließend wurde dieses Konstrukt in einem Konzentrationsbereich von 0,01 µg/Ansatz bis 0,9 µg/Ansatz mit in dem unter 3.1.3.3. beschriebenen Reportersystem (pPac1) in der Fibroblastenzelllinie 10T1/2 getestet.

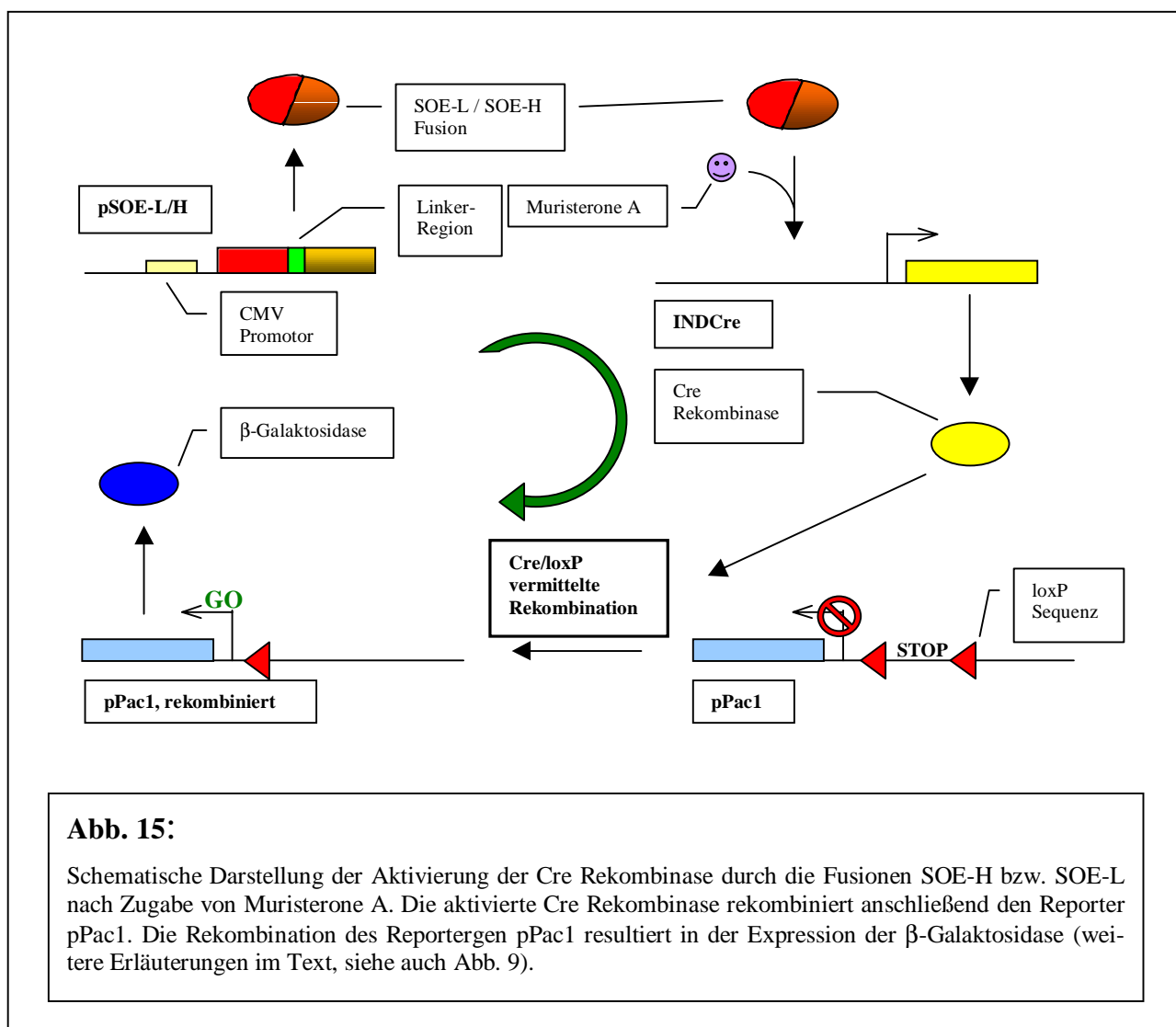


Wie man aus den Abb. 14 und 16 entnehmen kann, war die von dem IND-Promotor exprimierte Cre Rekombinase konstitutiv aktiv und ließ sich daher nicht mit dem Evan'schen Testsystem regulieren. In Abb. 14 ist dargestellt, daß das Konstrukt pINDCre in einem Konzentrationsbereich von 0,3 bis 0,9 µg/Ansatz in Abwesenheit des bicistronischen Transaktivator-konstruktes eine sehr hohe Hintergrundaktivität besaß. Dieses konnte nur unter der Annahme von Kreuzreaktionen von anderen nukleären Rezeptoren mit dem IND-Promotor in den 10T1/2 Zellen erklärt werden. Erst bei einer Konzentration von 0,01 µg/Ansatz war die Cre Rekombinase in dem vorgegebenen Testsystem vollständig inaktiv. Allerdings ließ sie sich in dieser Konzentration auch nicht mehr durch die Zugabe von Muristerone A aktivieren (Abb. 16). Der Einfluß der Muristerone A Gaben war ebenfalls völlig unerwartet und wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

Daher wurden in Kontrollexperimenten die ursprünglichen Versuche mit dem Reportergen pINDlacZ in 10T1/2 Zellen wiederholt. Diese bestätigten die publizierten Ergebnisse. Jedoch wurden keine 200fachen Induktionen, wie für die Zelllinie CV1 publiziert, sondern im Mittel nur ca. 40fache Induktionen erzielt (siehe Abschnitt 3.1.4.5.). Das bedeutete, daß das Evan'sche System im Prinzip zur transkriptionellen Steuerung von Enzymaktivitäten ausreichend war. Möglicherweise reichten aber, wie im Abschnitt 3.1.3.3. postuliert wurde, schon wenige Cre Moleküle aus, um den Reporter pPac1 vollständig zu rekombinieren.

3.1.4.2. SOE-H/SOE-L: Ein modifiziertes Transaktivator-System, das auf der Fusion des Ecdyson-Rezeptors mit dem Co-Rezeptor RXR beruht

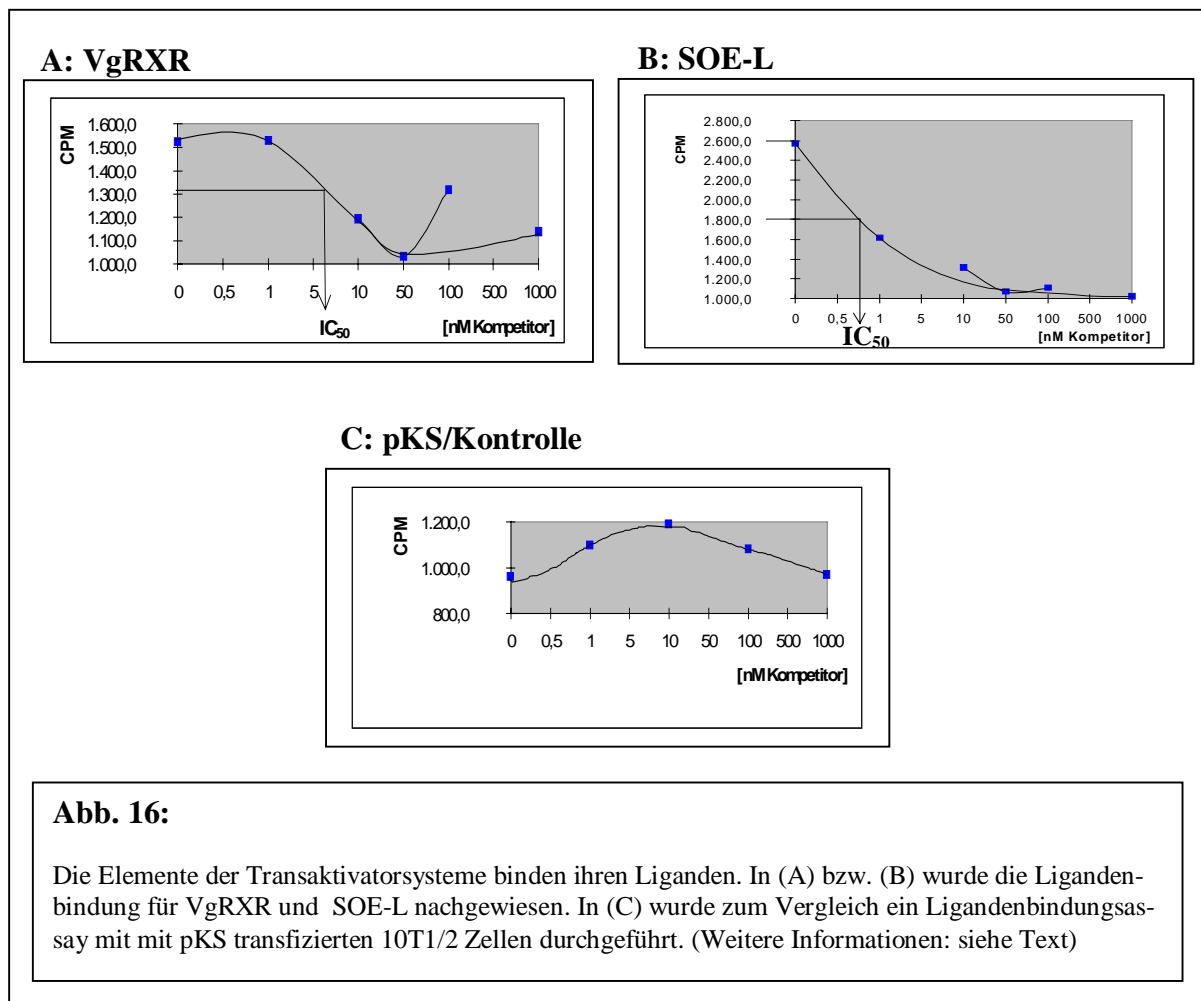
Um diesem Problem zu begegnen, wurde das Evan'sche Transaktivatorsystem modifiziert (Abb.15). Die Modifizierung basierte im wesentlichen auf eine Veränderung des Transaktivators. Im Kern wurden Fusionen aus den Heterodimerisierungspartnern VgEcR und RXR hergestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Fusionen getestet. Sie



unterschieden sich in dem Aufbau ihres Linkers zwischen der Ecdyson-Rezeptor-Domäne und der RXR-Domäne. Im Falle von SOE-H wurden die beiden Domänen einfach zusammengefügt und mit einer *HpaI* Klonierungsstelle versehen. SOE-L besitzt hingegen einen optimierten Domänen-Linker (Argos, 1990) mit der Aminosäuren-Abfolge Glycin-Serin-Glycin-Serin-Glycin. Beide wurden mit der Methode des „*Splicing of Overlap-Extension*“ generiert (siehe Material und Methoden). Das modifizierte Transaktivierungssystem ist schematisch in Abb. 15 dargestellt. Die Fusionen besaßen die gleichen DNA-Bindungsspezifitäten wie die Elemente des bicistronischen Konstrukts pVgRXR. Daher ließen sich die drei Konstrukte in einem direkten Vergleich mit dem pPac1 Reportersystem vergleichen. In Vorversuchen wurde gezeigt, daß die Konstrukte pSOE-H und pSOE-L den Reporter pINDlacZ nach Zugabe von Muristerone zu gleichen Anteilen und zu gleichen Raten wie pVgRXR induzieren konnten (Daten nicht gezeigt).

3.1.4.3. Die Elemente des Transaktivator-Systems binden ihren Liganden

In einem Kompetitions-Assay (Abb. 16) wurde der Nachweis gebracht, daß sowohl die Elemente des bicistronischen Konstrukts VgRXR als auch SOE-L den Ecdyson-Rezeptor Liganden

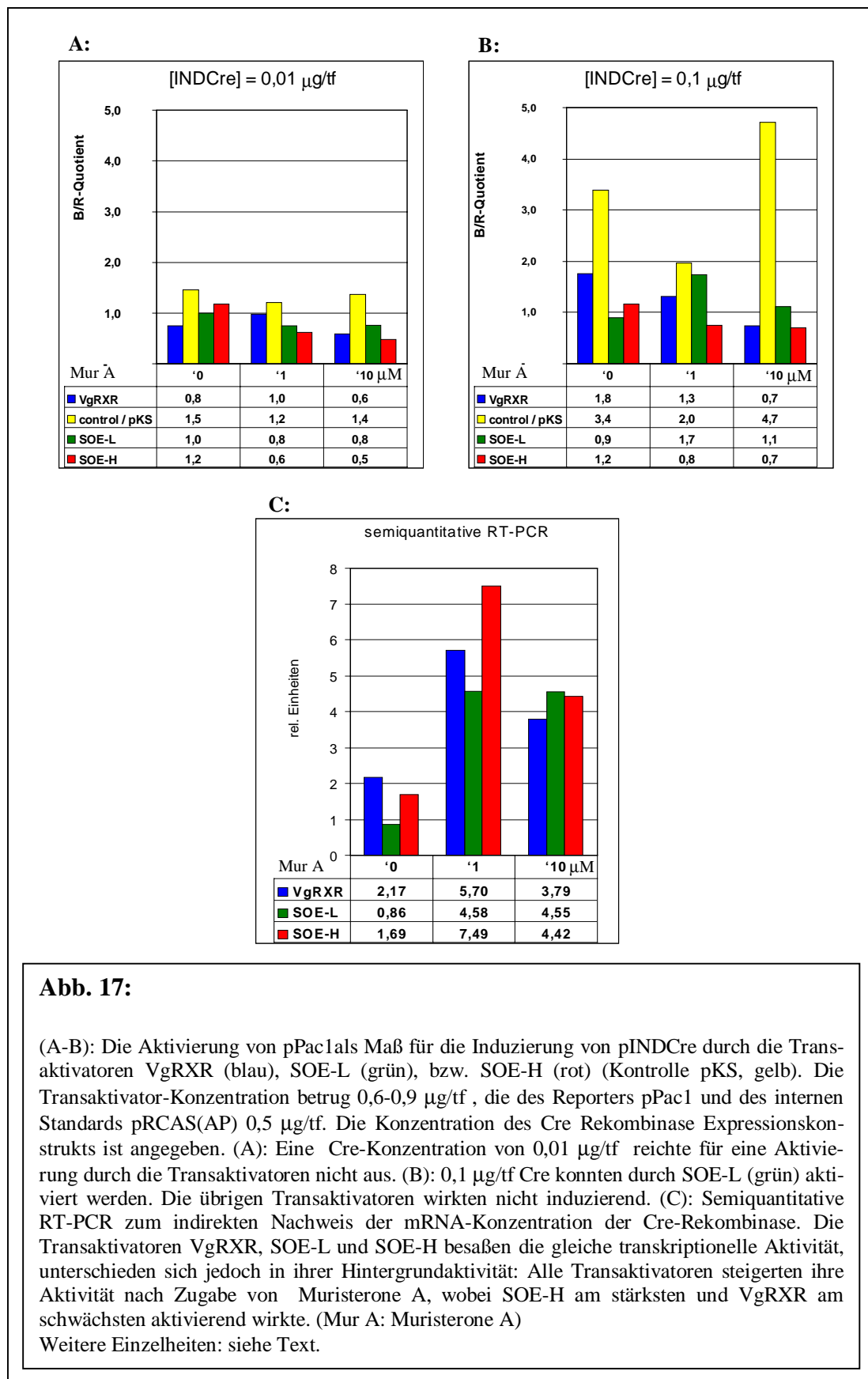


den Muristerone A banden. Die Kompetitions-Assays wurden ebenfalls mit Proteinextrakten aus transient transfizierten 10T1/2 Zellen durchgeführt. Als Kompetitor diente unmarkiertes Muristerone A, dessen Verdrängung von radioaktiv markierten Ponasterone A aus dem Ligand-Rezeptor-Komplex indirekt gemessen wurde (siehe auch 3.1.3.2.). Die graphische Auswertung der Kompetitionsassays (Abb. 16) ermöglichte die Ermittlung des IC_{50} -Wertes (Tab. 2). Die Affinität von SOE-L zu seinem Ligand war zehn Mal so hoch wie die von VgRXR. Möglicherweise wurde durch die Fusion mit dem RXR-Anteil die Gesamtkonformation so verändert, daß eine Bindung des Liganden an das Gesamtmolekül erleichtert wurde.

Tabelle 2: IC_{50} -Werte für Elemente der Transaktivatorsysteme VgRXR und SOE-L.	
Konstrukt	IC_{50}-Wert
VgRXR	7 nM
SOE-L	0,7 nM
Die IC_{50} -Werte aus den Messungen des Kompetitionstests abgeleitet.	

3.1.4.4. Test des bicistronischen und des modifizierten Transaktivator-Systems

pINDCre wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, um Basalaktivitäten und Wirkkonzentrationen auszutesten. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in Abb. 17 dargestellt. Dem Gesamtergebnis liegen insgesamt zehn unabhängige Transfektionen zugrunde. Wiederum wurde auf die Darstellung der Standardabweichung aufgrund der Anzahl der Messungen verzichtet. Wie man der Abb.17 (A-B, Daten nicht gezeigt) entnehmen kann, konnten die drei Transaktivatoren die Aktivität der Cre Rekombinase mit einer Ausnahme nicht kontrollieren. SOE-L (grüne Säulen) war als einziger Transaktivator in der Lage, die Cre Rekombinase bei einer Konzentration von 0,1 μ g/Ansatz und bei Verwendung geringer Muristerone A Dosen (1 μ M) zu induzieren (Abb. 17 B). Im Mittel verdoppelte sich dabei die Cre-Aktivität. Bei höheren Muristerone A Konzentrationen fiel sie jedoch auch hier wieder auf das Basallevel zurück. Auffällig war zudem die relativ hohe Basalaktivität der Cre Rekombinase für die Transaktivatoren VgRXR und SOE-H. Diese Basalaktivität konnte nur in Gegenwart des Transaktivators SOE-L vermindert werden. Dabei schien es nicht eine Fusion aus dem Ecdyson-Rezeptor und RXR an sich zu sein, die eine Aktivierung der Cre Rekombinase ermöglichte. SOE-H wirkte wie das Ausgangskonstrukt VgRXR inhibierend. Vielmehr kam es auf die



Verknüpfung der beiden Partner an. Der von Argos ermittelte optimale Linker für die Verknüpfung zweier Proteindomänen schien die Ursache für die Aktivität von SOE-L zu sein. Ferner war die Konzentration des Cre Rekombinase Expressionsvektors von Bedeutung. Bei

hohen oder niedrigen Cre-Konzentrationen war die Cre Rekombinase nicht aktivierbar (Abb. 17A, B; Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Verhaltensweisen der Transaktivatoren VgRXR und SOE-H einerseits und SOE-L andererseits auf transkriptionellen oder posttranslationalen Mechanismen beruhten, wurde die RNA transient transfizierter 10T1/2 Zellen isoliert. Anschließend wurde die Konzentration der mRNA für die Cre Rekombinase semiquantitativ durch eine RT-PCR bestimmt (Abb. 17 C). Als Standard diente wiederum der Alkalische Phosphatase Expressionsvektor pRCAS(AP). Nachdem die Anzahl der Zyklen bestimmt war, bei der das AP spezifische Produkt mit einer Größe von 150 bp noch im logarithmischen Bereich amplifiziert wurde, wurde die Cre Rekombinase mit der gleichen Anzahl von Zyklen aus den einzelnen Transfektionsansätzen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit der *NIH Image 1.54* Software densitometrisch ausgewertet. Drei verschiedene semiquantitativen RT-PCR's wurden für die Ermittlung der mittleren relativen Cre-Induktion durchgeführt und graphisch ausgewertet.

Die erhaltenen Resulte der RT-PCR belegten klar, daß durch alle Transaktivatoren nach Zugabe von Muristerone A eine transkriptionelle Aktivierung ausgelöst wurde (Abb. 17 C). Ferner wurde gezeigt, daß erst die Abnahme der Cre Rekombinasen Aktivität bei höheren Muristerone A Konzentrationen (10 μ M) transkriptionell bedingt war.

Es hätten aber Unterschiede in den Cre-mRNA Konzentrationen nachweisbar sein müssen, wenn den jeweiligen Transaktivierungsmodi der drei Regulatoren ein anderer Mechanismus zugrunde gelegen hätte. Wie das Ergebnis ist in Abb.17 C jedoch zeigt, unterschieden sich die Transaktivierungsraten der drei Transaktivatoren VgRXR, SOE-H und SOE-L in 10T1/2 nicht wesentlich voneinander. Das war ein unerwartetes Ergebnis, zumal gezeigt werden konnte, daß lediglich SOE-L bedingt aktivierend auf die Gesamtaktivität der Cre Rekombinase wirkte (Abb. 17). Dafür gab es Unterschiede in den Basalaktivitäten des pIND Promotors in Gegenwart der drei Regulatoren. In Gegenwart von SOE-L war die Basalaktivität von pINDCre um ca. 60 % reduziert im Vergleich zu VgRXR (0,86 zu 2,17). Das konnte als Hinweis verstanden werden, daß die Gründe für das unterschiedliche Verhalten der drei Transaktivatoren nichts mit dem Aktivierungsprozeß der Cre Rekombinase per se zu tun hatten, sondern in Zusammenhang mit der Hintergrundaktivität des IND-Promotors standen (siehe Diskussion).

In diesem Zusammenhang ist anzumerken, daß die Cre Rekombinase vom Vektor pINDCre, wie im vorherigen Abschnitt (Abb. 14) gezeigt, durch einen unbekannten Transkriptionsfaktor in 10T1/2 Zellen aktiviert werden konnte. Diese Basalaktivität war auch nach dem Zusatz von Muristerone A unerwartet hoch, wie aus der Aktivität der Cre-Rekombinase bei einer Co-

Transfektion mit der Kontrolle pKS abzulesen ist (gelbe Säulen in Abb. 17 A-B). Diese Basalaktivität nahm bei niedrigen Muristerone A Gaben unabhängig von der Konzentration der Cre Rekombinase immer ein wenig ab und stieg dann bei höheren Muristerone A Gaben sogar im Mittel über die uninduzierte Hintergrundaktivität hinaus an. Die mit den Transaktivatoren erzielten Cre-Aktivitäten waren in allen Fällen niedriger als die „Basalaktivität“ ohne exogenen Transaktivator mit dem Kontrollvektor pKS. Fehlende Synergie-Effekte lassen auf zwei unabhängige Aktivierungswege schließen. Man muß sogar von kompetitiven Mechanismen ausgehen. Ohne Muristerone A war die Basalaktivität im allgemeinen geringer, wenn Transaktivatoren co-transfiziert waren (Abb 17 A, B). Die Transaktivatoren hatten demnach eine höhere Affinität zu den artifiziellen DNA-Bindungsstellen von pIND als der unbekannte Transaktivator in den 10T1/2 Zellen.

3.1.5. Die Kombination von transkriptionellen und posttranslationalen Kontrollelementen führt zur verlässlichen Regulation der Cre Aktivität

In den Abschnitten 3.1.2. bis 3.1.4. wurde gezeigt, daß der Ecdyson-Rezeptor bzw. die E-Domäne des Ecdyson-Rezeptors im Prinzip als molekularbiologisches Werkzeug zur transkriptionellen bzw. posttranslationalen Regulation eines heterologen Transaktivators verwendet werden konnte. Allerdings wurde in den vorangegangenen Abschnitten auch gezeigt, daß sich die Cre Rekombinase einer Regulation durch diese Kontrollelemente letztendlich entzog. Sowohl das transkriptionelle als auch das posttranslationale Steuerungssystem war für sich genommen nicht ausreichend, um eine verlässliche Kontrolle der Cre Aktivität zu gewährleisten.

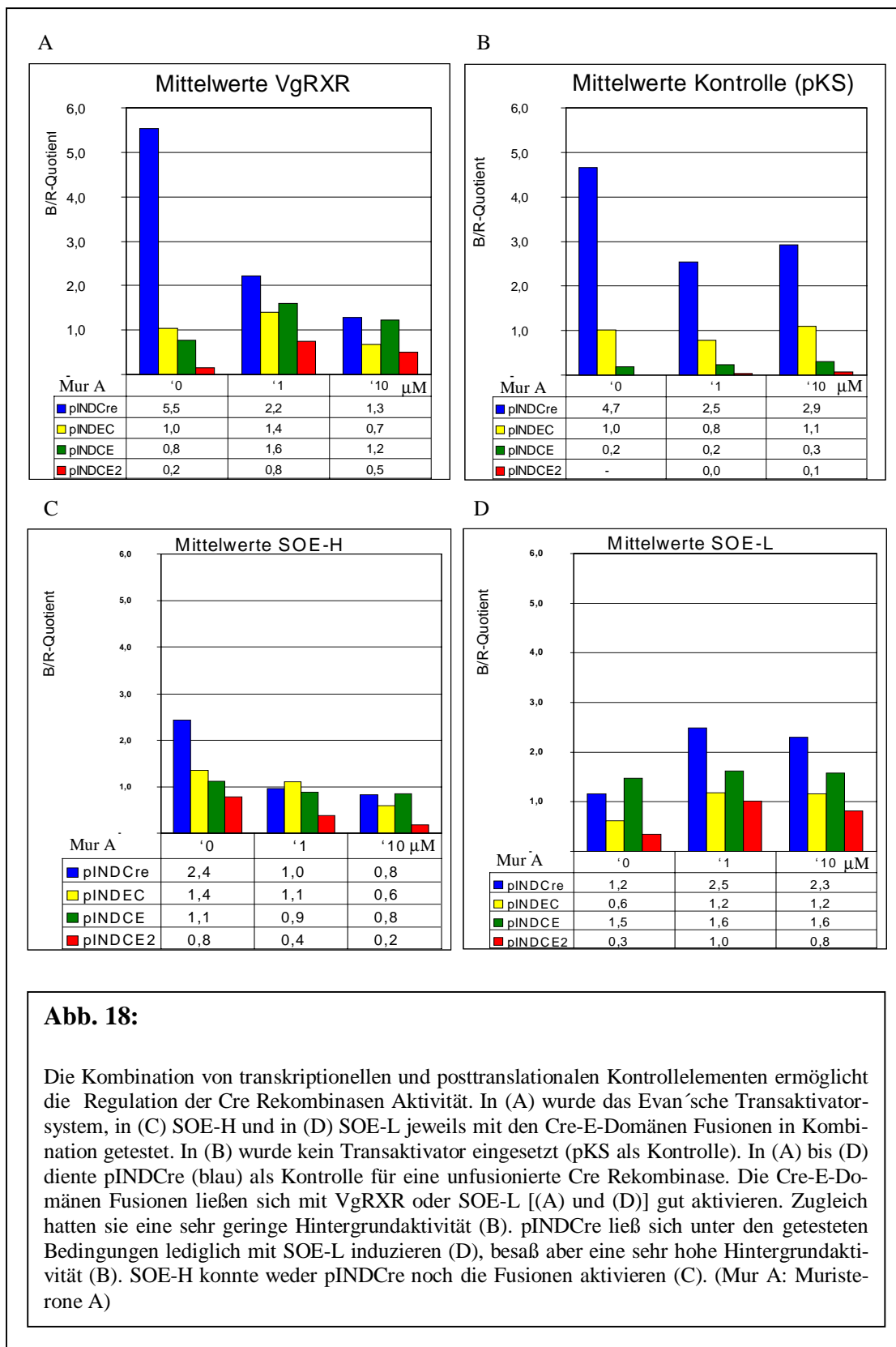
Der kritische Punkt lag dabei in einer Reduzierung ihrer Basalaktivität. Die relativ hohen Basalaktivitäten verdeckten eine Induzierung durch die Transaktivatoren auf transkriptioneller Ebene. Es mußte sichergestellt werden, daß eine vorzeitig transkribierte Cre Rekombinase nicht aktiv werden konnte. Das führte zu Überlegungen, die Cre-E-Domänen Fusionen mit dem Evan'schen bzw. modifizierten Transaktivator-System zu kombinieren. Durch die Kopplung von transkriptionellen mit posttranslationalen Kontrollelementen sollte sich die Cre Rekombinase verlässlich regulieren lassen.

Daher wurden die Cre-E-Domänen, wie sie in Abb. 7 dargestellt wurden, in den Expressionsvektor pIND subkloniert. Das entstandene Konstrukt wurde pINDEC, pINDCE bzw. pINDCE₂ genannt. Diese konnten nun, ganz analog wie pINDCre, mit dem Evan'schen und dem modifizierten Transaktivatorsystem unter gleichen Bedingungen in 10T1/2 getestet werden (zum Mechanismus: siehe Abb. 15). Dabei wurden verschiedene Konzentrationen für die Transaktivatoren und Rekombinasen verwendet. Diese erstreckten sich über einen Bereich von 0,3-1,5 µg/Ansatz für die Transaktivatoren und 0,1-0,3 µg/Ansatz für die Rekombinasen. Innerhalb dieses Konzentrationsbereichs wurde in vorangegangenen Experimenten für

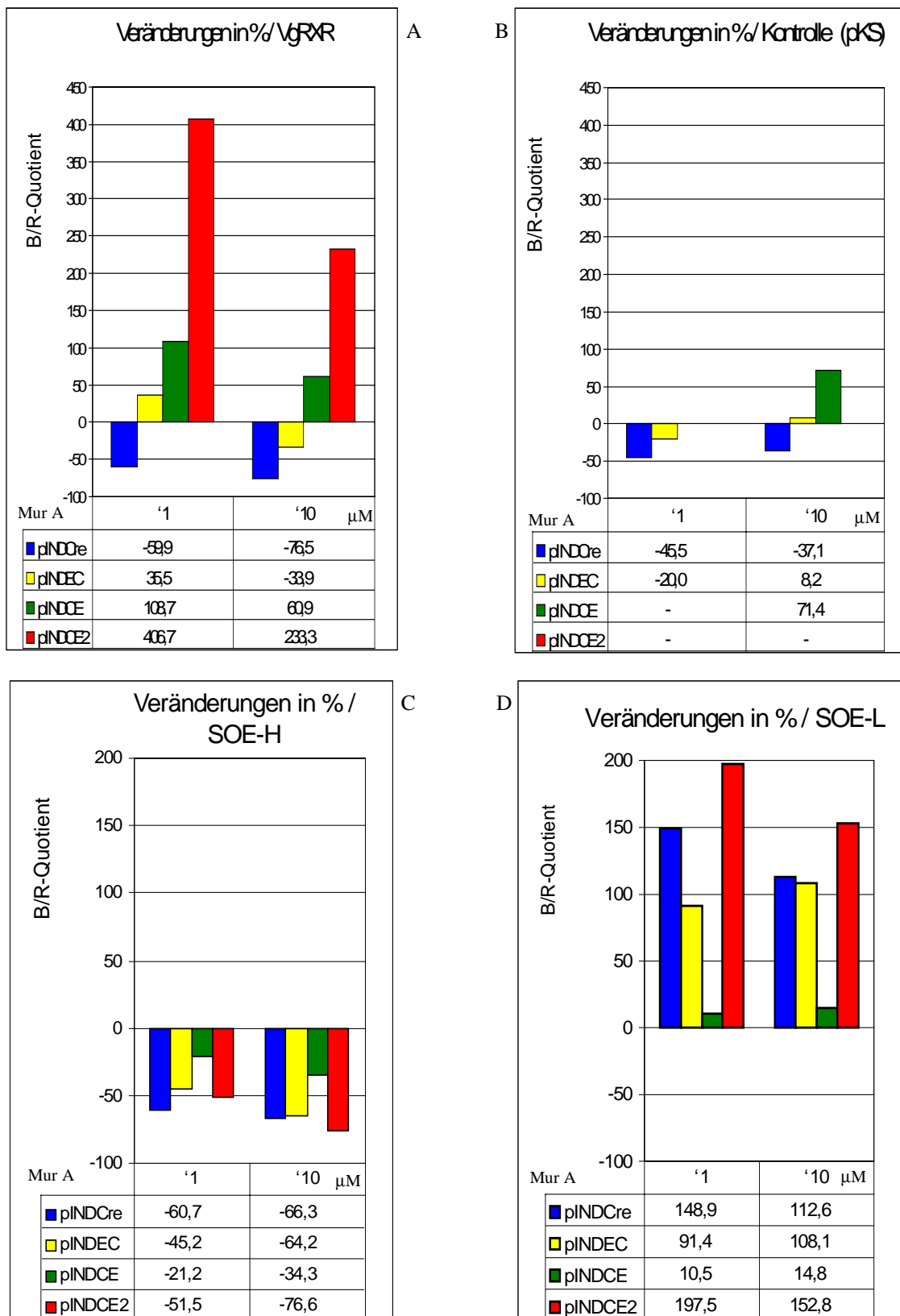
pINDCre eine Aktivitätsänderung festgestellt (Abb. 17, Daten nicht gezeigt). Das Gesamtergebnis wurde in den Abb. 18 und 19 graphisch ausgewertet. Für jeden Muristerone A Konzentrationsbereich und für jedes Konstrukt lagen jeweils mindestens fünf und bis zu sieben unabhängige Messungen vor. Auf eine Darstellung der Standardabweichungen wurde wiederum verzichtet.

Abb.18 zeigt die Auswertung der B/R-Quotienten für alle denkbaren Kombinationen des transkriptionellen mit dem posttranslationalen System. Zum Vergleich wurde pINDCre, das für die unmodifizierte Cre Rekombinase kodiert, co-transfiziert. Dabei wurden die Ergebnisse aus früheren Versuchsteilen (Abb. 15) bestätigt. Die unmodifizierte Cre Rekombinase ließ sich nur mit dem Transaktivator SOE-L aktivieren (Abb. 18). Die maximale Induktion wurde dabei bei 1 μ M Muristerone A mit einer 148,9 %-igen, bzw. 2,1 fachen Aktivitätssteigerung erzielt (Abb. 19). Auf der anderen Seite ließ sich die unmodifizierte Cre Rekombinase mit den Transaktivatoren (VgRXR (A) und SOE-H (C)) nicht aktivieren. Im Gegenteil, die Aktivitäten sanken um mehr als die Hälfte (Abb. 18, siehe auch Abb. 17). Gleichzeitig war die Hintergrundaktivität der Cre Rekombinase viel höher als alle erzielten Induktionen mit den anderen Konstrukten (Abb. 18).

Die Cre-E-Domänen Fusionen verhielten sich dagegen anders (Abb. 18, 19). Sie konnten nämlich sowohl von dem modifiziertem Transaktivator SOE-L als auch von dem Evan'schen Transaktivator VgRXR aktiviert werden. Dabei waren die einzelnen Aktivierungen von der Position und Anzahl der E-Domänen abhängig. Die besten Induktionen wurden für CE₂ erzielt. Hier wurden nach Zugabe von 1 μ M Muristerone A mit dem Transaktivator SOE-L beinahe eine 200 %-ige und mit dem Transaktivator VgRXR eine 400 %-ige Aktivitätssteigerung erreicht (Abb. 19). Das entsprach einer 5 fachen Steigerung für die Kombination aus VgRXR und CE₂, bzw. einer 3 fachen Steigerung für eine Kombination mit SOE-L. Interessanterweise ließ sich CE₂ ausgerechnet mit dem Evan'schen Transaktivator VgRXR optimal aktivieren (Abb. 18). Dieses war wahrscheinlich auf die geringe Hintergrundaktivität von CE₂ zurückzuführen. Sie war beinahe 30 Mal geringer als die der unmodifizierten Cre Rekombinase (Abb. 18A: 5,5 zu 0,2). Für CE₂ betrug der induzierte Wert von 0,8 bei 1 μ M Muristerone A immer noch ein Siebtel des uninduzierten Wertes der unmodifizierten Cre Rekombinase (5,5). Daß VgRXR theoretisch als transkriptioneller Aktivator wirksam sein konnte, wurde im Abschnitt 3.1.4.4. anhand der induzierten mRNA-Level der unmodifizierte Cre Rekombinase bewiesen. Daher war die hohe Basalaktivität des IND-Promotors der wahrscheinliche Grund für die Wirkungslosigkeit der Transaktivatoren. Wurde CE₂ ohne Transaktivator transfiziert (Abb. 18, 19), sank die Hintergrundaktivität sogar auf Null. Im Vergleich dazu betrug der B/R-Quotient für die unmodifizierte Cre Rekombinase 4,7 (Abb. 18B). Dieses war der in dem verwendeten Testsystem zweithöchste absolute Wert für eine Cre Rekombinasen-Aktivität.



Außer CE₂ wurden auch noch die Fusionen EC und CE getestet. Sie verhielten sich ähnlich wie CE₂, allerdings ließen sie sich nicht so gut induzieren. Interessanterweise ließ sich CE, das die klassische 3' Verknüpfung mit dem Effektor darstellte, mit dem Transaktivator SOE-L nicht aktivieren (Abb. 18D, 19D). Beide Konstrukte besaßen eine geringere Hintergrundaktivität als die unmodifizierte Cre Rekombinase, allerdings lag diese höher als bei CE₂. Dieses

**Abb. 19:**

Prozentuale Veränderung der Cre Rekombinasen Aktivität im Kombinationssystem. In (A) wurde das Evan'sche Transaktivatorsystem, in (C) SOE-H und in (D) SOE-L jeweils mit den Cre-E-Domänen Konstrukten in Kombination getestet. In (B) wurde kein Transaktivator eingesetzt (pKS als Kontrolle). (Mur A: Muristerone A)

könnte eine Erklärung für die intermediäre Stellung ihrer enzymatischen Aktivität sein, die zwischen Cre und CE₂ lag. Alle Konstrukte ließen sich mit dem Transaktivator VgRXR induzieren, obgleich das Optimum der Muristerone A Konzentration verschieden war. So ließ sich EC auch nur bei geringen Muristerone A Konzentrationen aktivieren. Die Induktion mit dem modifizierten Transaktivator SOE-L fiel dagegen geringer aus als für die unmodifizierte Cre Rekombinase. Eine Fusion der Cre Rekombinase mit der E-Domäne führte also nicht in jedem Fall zu einer Optimierung des Induktionsvermögens.

Wie schon für die unmodifizierte Cre Rekombinase festgestellt wurde, war die bloße Fusion des Transaktivators VgRXR nicht unbedingt von Vorteil für die Induktion der Cre Rekombinase. Der modifizierte Transaktivator SOE-H konnte keine Cre-Fusion aktivieren, u.a., weil sein Einsatz eine relativ hohe Hintergrundaktivität in der Cre-Fusionen Aktivität nach sich zog (Abb. 18C, 19C). In Vorversuchen wurde nachgewiesen, daß sich mit der Fusion SOE-H das Konstrukt pINDlacZ sogar noch besser aktivieren ließ als mit VgRXR (Daten nicht gezeigt). Dieser generelle Aktivitätsanstieg könnte sich im Falle der Regulation der Cre Rekombinase negativ auswirken, da damit auch die Hintergrundaktivität anstieg. (Abb. 18C, 19C).

3.1.6. Eine Alternative zum Liganden Muristerone A: Ponasterone A zeigt höhere Induktionsraten

In dem Zeitraum, in dem die oben beschriebenen Experimente durchgeführt wurden, wurde die Produktion des Liganden Muristerone A aus kostentechnischen Gründen von der Fa. Sigma eingestellt. Weltweit sind die Vorräte an Muristerone A mittlerweile erschöpft, so daß eine wichtige Komponente der induzierbaren Transaktivatorsysteme, der Induktor selbst, nicht mehr zur Verfügung steht. Dieser Umstand veranlaßte mich (und andere), nach Alternativen für den Liganden Muristerone A zu suchen. In der Folge konnte ich unabhängig von anderen Arbeitsgruppen Ponasterone A erfolgreich für die Induktionsversuche innerhalb der beschriebenen Testsysteme einsetzen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mengen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. R. Lafont (Inst. Pasteur, Paris) zur Verfügung gestellt. Ponasterone A unterscheidet sich vom Muristerone A durch zwei zusätzliche Hydroxyl-Gruppen sowie einer zusätzlichen Doppelbindung im Cholesterol-Anteil. ($MW_{\text{Muristerone A}} = 496,6$; $MW_{\text{Ponasterone A}} = 464,6$).

Die Liganden wurden mit dem Evan'schen Transaktivator VgRXR getestet und verglichen (Tab. 3). Als Reporter diente in beiden Fällen pINDlacZ. Wie man Tab. 3 entnehmen kann, war Ponasterone A bei einer Konzentration von 1 μM aktiver als Muristerone A. Während sich pINDlacZ mit Muristerone A nur ungefähr neunfach induzieren ließ, war seine Aktivität nach Induktion durch Ponasterone A 23 Mal so hoch. Weitere Versuche zeigten, daß sich bei

höheren Muristerone A Dosen (10 μM) die Induktion durch VgRXR noch weiter verstärken ließ. Der B/R-Quotient erzielte dann einen Wert von 11,8, was eine Steigerung um 5336 % (40 fach) gegenüber der Basalaktivität entsprach.

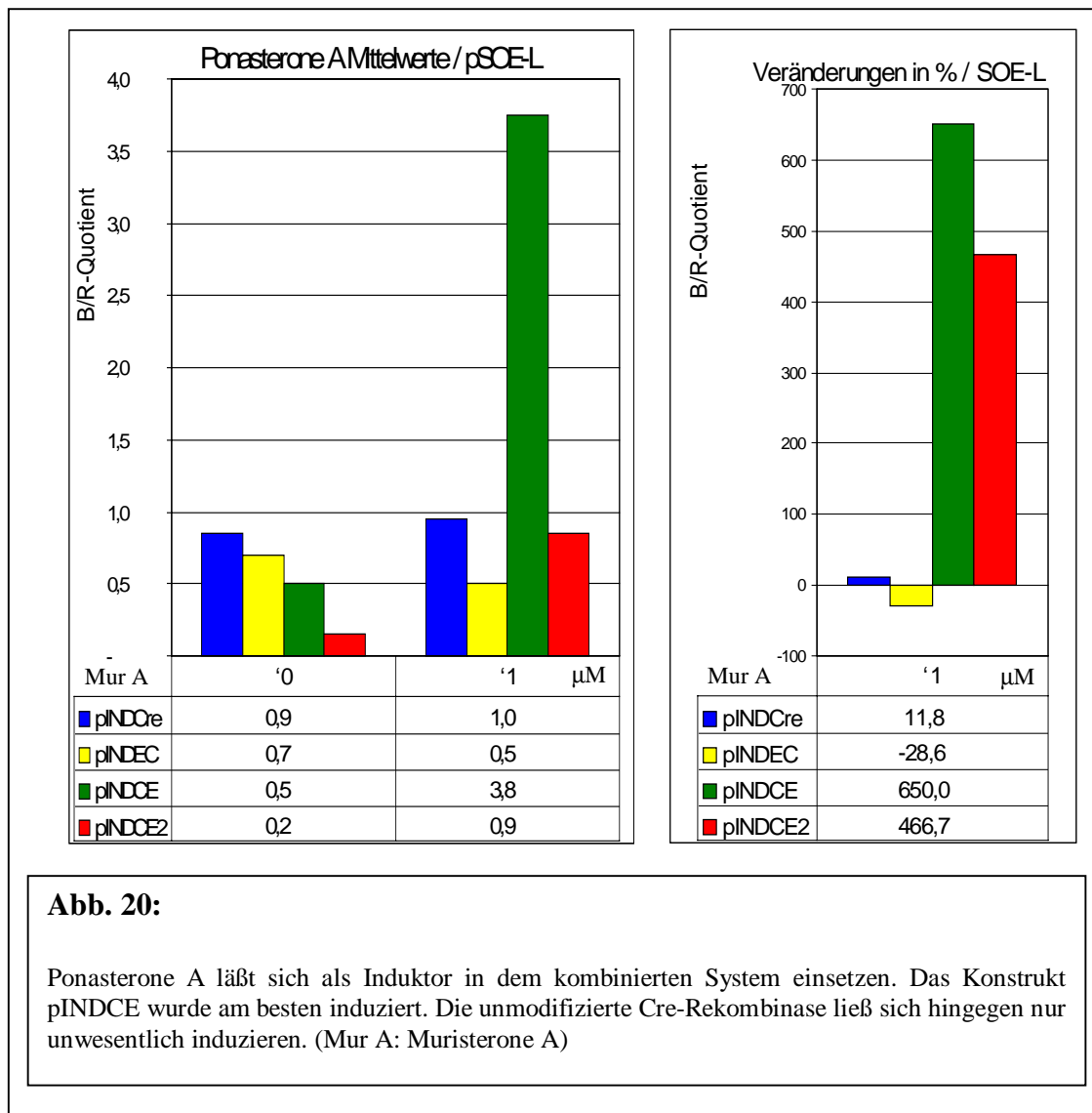
Ponasterone A wurde auch auf seine Eignung als Induktor in dem kombinierten Transaktiva-

Tabelle 3:

Vergleich der Liganden Ponasterone A und Muristerone A in dem funktionellen Testsystem aus VgRXR und INDlacZ

Induktor	Muristerone A		Ponasterone A	
Konzentration [μM]	B/R- Quotient	Veränd. in %	B/R- Quotient	Veränd. in %
0	+ 0,3	--	+ 0,2	--
1	+ 2,6	263	+ 4,6	2200
10	+ 11,8	5336	n.d.	n.d.
Den angegebenen Werten liegen die Ergebnisse zweier unabhängiger Transfektionen zugrunde.				

torsystem, das transkriptionelle und posttranslationale Kontrollelemente vereinte, getestet. Als Zielgene dienten wiederum die Cre Rekombinase, bzw. die Cre-E-Domänen Fusionen. Die Ergebnisse waren ähnlich wie jene, die mit Muristerone A erzielt wurden (Daten nicht gezeigt). D.h., VgRXR und SOE-L eigneten sich als Transaktivator, die Cre Rekombinase als Bestandteil von Fusionen zu aktivieren. Die Fusionen zeigten wieder die geringsten Aktivierungen in den Kontrollen ohne Transaktivator (Daten nicht gezeigt). Allerdings gab es zwei signifikante Unterschiede zu den Induktionen mit Muristerone A. Zum einen war SOE-L aktiver als VgRXR (Abb. 20, Daten nicht gezeigt). Zum anderen schien Ponasterone A vor allem die Cre-Fusion CE zu aktivieren. Dieses war für den Transaktivator SOE-L besonders ausgeprägt (Abb. 20). Dieses ist insofern bemerkenswert als sich CE mit Muristerone A als Induktor beinahe überhaupt nicht induzieren ließ (Abb. 18, 19). Interessanterweise konnte die unmodifizierte Cre Rekombinase aufgrund der hohen Hintergrundaktivität nur unwesentlich aktiviert werden. Aufgrund der Anzahl der Messungen wurde auf eine graphische Darstellung der Standardabweichung verzichtet.



3.1.7. Das kombinierte Transaktivatorsystem ist in embryonalen Stammzellen wirksam

Um zu testen, in wie weit die in der Fibroblasten-Zelllinie 10T1/2 erzielten Ergebnisse Allgemeingültigkeit besitzen, wurde das kombinierte Transaktivatorsystem in einer weiteren Zelllinie analysiert. Damit wurde nachgewiesen, daß das Transaktivatorsystem ubiquitär einsetzbar ist.

Mit dem modifiziertem Subtyp #283 der ES-Zelllinie J1 wurde eine Zelllinie ausgewählt, deren Eigenschaften sich erheblich von denen der Fibroblastenzelllinie absetzte. Sie besaß ein endogenes, modifiziertes Myf5Gen, das von jeweils einer loxP Sequenz flankiert, d.h. gefloxt war. Im Intron 1 war darüber hinaus eine gefloxt Neomycin-Resistenzgen- und eine HSV Thymidin-Kinase Gen-Kassette eingefügt (zur Generierung dieses Allels sowie für weitere Informationen siehe 3.2.1.). Damit bestanden ganz andere Anforderungen an die Cre Rekombinase und damit an das Regulationssystem. Die Cre/loxP vermittelte Rekombination hatte nicht an

einem transient überexprimierten episomalen Vektor zu erfolgen, sondern an einem „single-copy“ Gen innerhalb seines genomischen Kontexts. Die damit einhergehende Reduktion des Substrat-Pools (pro Zelle befanden sich lediglich drei loxP Sequenzen) machte eine stringente Kontrolle der sehr aktiven Cre Rekombinase notwendig. Darüber hinaus stellte die ES-Zelllinie #283 ein anwendungsbezogenes Modell für den Test des Kombinationssystems dar.

Die Komponenten des Transaktivatorsystems wurden dabei via transienter Elektroporation in $2,6 \times 10^6$ ES-Zellen geschleust. Davon wurden $1,6 \times 10^4$ und $1,6 \times 10^5$ Zellen auf 6cmØ Kulturschalen ausplattiert. 24-48 h nach der Elektroporation setzte eine negative Selektion mit FIAU ein, um ES-Zell-Klone, in denen eine Cre/loxP vermittelte Rekombination nicht zur Deletion der HSV-tk Gen-Kassette geführt hatte, abzutöten. Ein Teil der Zellen wurde mit 1 μ M Muriesterone A haltigem Medium versetzt, um die jeweilige Cre oder Cre-E-Domänen Fusion zu aktivieren. Die Selektion mit FIAU und die täglichen Gaben an Muristerone A wurden für ca. 14 Tage durchgeführt. Danach wurden die Anzahl der Kolonien für jedes Konstrukt bestimmt. Ein repräsentativer Anteil wurde gepickt und für eine Southern-Analyse subkultiviert. Richtig rekombinierte Kolonien hatten eine Cre/loxP vermittelte Deletion der HSV-tk Gen-Kassette ausgeführt und waren gegen FIAU resistent. Aufgrund des hohen Selektionsdrucks kam es vermehrt zu aberranten, nicht Cre/loxP vermittelten Rekombinationen, die ebenfalls zu FIAU resistenten Klone führten. Diese konnten im Southern Blot nachgewiesen und von den richtig rekombinierten Klonen unterschieden werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

In Kontroll-Elektroporationen wurden entweder die Transaktivatoren VgRXR und SOE-L oder die pIND-Expressionsvektor mit den Cre-Konstrukten allein getestet. Dabei wurden unabhängig von der Anwesenheit der Elemente des Rekombinationssystems eine gewisse Anzahl von FIAU resistenten Kolonien erhalten, die ihre Resistenz jedoch alle – mit einer Ausnahme (siehe unten) – spontan erhalten hatten. Dieses war auf den hohen Selektionsdruck zurückzuführen, der durch die FIAU Behandlung auf die Zellen ausgeübt wurde. In den meisten Fällen resultierte diese Resistenz in eine Deletion des kompletten Chromosoms, welches das HSV-tk Gen exprimierte. In der Regel besaß ca. 1 von 8000 Kolonien eine Spontanresistenz, wenn man voraussetzte, daß a) im Mittel 8×10^4 Zellen ausplattiert wurden, und daß b) aus jeder Zelle eine Kolonie hervorging. In Wirklichkeit dürfte der Anteil der spontan resistenten Zellen aber geringer gewesen sein.

In der Kontrollreaktion, die mit dem Expressionskonstrukt pINDCre elektroporiert wurde, wurde im Vergleich zur Negativ-Kontrolle eine weit höhere Anzahl an resistenten ES-Zellkolonien erzielt. Die Analyse von zufällig ausgewählten Kolonien im Southern-Blot ergab, daß ca. zwischen 60 und 75 % dieser Klone eine Cre/loxP vermittelte Rekombination ausgeführt hatten. Die Anzahl dieser war dabei unabhängig von der Zugabe des Liganden Muriesterone A. Der IND-Promotor konnte demnach von anderen nukleären Rezeptoren aktiviert

werden. Dieses Ergebnis stand in Übereinkunft mit den in 10T1/2 Zellen. Während man die Fibroblasten-Zelllinie theoretisch in Wachstumsfaktor-armen Medium kultivieren konnte, um diesen Effekt zu vermeiden, schloß sich diese Alternative für die sehr viel empfindlicheren ES-Zellen von vorne herein aus. Die Elektroporation der Transaktivatoren VgRXR bzw. SOE-L zusätzlich zu pINDCre bewirkte keine Zunahme der FIAU resistenten Klone. Allerdings erhielt man mehr Cre/loxP resistente Klone nach der Zugabe von Muristerone A.

Die hohe Hintergrundaktivität des ausschließlich auf einer Transkriptionskontrolle basierenden Systems machte wiederum eine Kombination von transkriptionellen und posttranslationalen Kontrollelementen notwendig, um eine verlässlichere Kontrolle der Cre Rekombinase zu erhalten.

Wurden die Cre-Fusionen elektroporiert, konnte in der Kombination von VgRXR und EC in Gegenwart von 1 μ M Muristerone A in zwei von neun untersuchten Klonen (22%) eine Cre/loxP vermittelte Rekombination nachgewiesen werden. Zugleich sank die Anzahl der FIAU resistenten Klone in Abwesenheit eines Transaktivators oder des Induktors Muristerone A auf die Anzahl der spontan rekombinierenden ES-Zellklone zurück. Keiner der getesteten FIAU resistenten Klone entstand dabei durch eine Cre/loxP vermittelte Rekombination. Damit war der Beweis für die Wirksamkeit des Kombinationssystems aus transkriptionellen und posttranslationalen Kontrollelementen zur Regulation der Cre Rekombinase in ES Zellen erbracht. Allerdings ließen sich zwei der getesteten Cre-Fusionen, CE und CE₂, auch nach Zugabe von Muristerone A nicht aktivieren.

Als Fazit läßt sich festhalten, daß das in 10T1/2 etablierte kombinierte Testsystem auch in ES-Zellen aktiv war. Das Evan'sche Kontrollsystem zur Steuerung der unmodifizierten Cre Rekombinase war wiederum nicht ausreichend, die Cre Rekombinasen Aktivität in Abhängigkeit von Ligandengaben zu steuern. Die Kombination von transkriptionellen und posttranslationalen Kontrollelementen ließ eine Regulation der Cre Rekombinase zu, allerdings war die Effektivität gering. Ein wichtiger Unterschied zu den 10T1/2 Zellen war, daß der Reporter ein endogener Locus in einer ES-Zelllinie war. Während die Cre/loxP vermittelte Rekombination in der Fibroblastenzelllinie im Cytoplasma ablief, war hier zunächst eine nukleäre Translokation des Enzymkomplexes notwendig, ehe die Rekombination stattfinden konnte. Sowohl die Cre Rekombinase als auch die Fusionen (mit Einschränkung) waren offensichtlich zu einer nukleären Translokation befähigt.

3.2. Generierung und funktionelle Test eines homozygoten $Myf5^{loxP/loxP}$ Mäusestamms mit Hilfe der ES-Zell-Technologie

Das bisher beschriebene Transaktivatorsystem zur konditionellen Regulierung von Zielgenen

Tabelle 4:**Das kombinierte Transaktivatorsystem in der ES-Zelllinie #283**

		Kontrolle		pINDCre		pINDEC		pINDCE		pINDCE ₂	
		nur FIAU	FIAU + Mur A	nur FIAU	FIAU + Mur A	nur FIAU	FIAU + Mur A	nur FIAU	FIAU + Mur A	nur FIAU	FIAU + Mur A
Kontrolle	Σ Kol ¹	konfl	konfl	121	108	9	10	5	8	8	11
	Index ²	n.a.	n.a.	11/14 78 %	11/19 58 %	0/8	0/10	0/5	0/7	0/3	0/8
VgRXR	Σ Kol ¹	7	10	99	59	4	10	11	9	7	12
	Index ²	0/4	0/3	7/12 58 %	12/16 75 %	0/4	2/9 22 %	0/6	0/9	0/4	0/9
SOE-L	Σ Kol ¹	6	7	69	81	9	8	6	10	3	10
	Index ²	0/3	0/2	6/13 46 %	6/9 66 %	0/5	0/5	0/5	0/8	0/3	0/10

Die elektroporierten Zellen wurden in zwei Ansätze geteilt und auf zwei Kulturschalen ausplattiert. Eine wurde anschließend ausschließlich nur mit FIAU, die andere zusätzlich mit Muristerone A (Mur A) kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Elektroporationen ausgewertet: Σ Kol¹ - Anzahl der Kolonien nach Ablauf des Selektionszeitraums; Index² - Anzahl der Cre/loxP rekombinierten Klone / Anzahl der untersuchten Klone; der Quotient wurde zusätzlich in Prozent angegeben (im Falle Index > 0 % [rot]). Die einzige Kombination, die eine verlässliche Induktion der Cre Aktivität ermöglichte, wurde zusätzlich doppelt gerahmt. Dieser Tabelle liegen insgesamt 3 unterschiedliche Elektroporationen zugrunde. (konfl: konfluent; n.a.: nicht analysiert)

eignet sich nicht nur für *in vitro* Studien. In Kombination mit der Cre Rekombinase ist ein Werkzeug geschaffen worden, das auf sehr vielfache Weise für die Überexpression von Genen (wie am Gen für lacZ bisher demonstriert) oder die Ablation von DNA-Sequenzen *in vitro* und *in vivo* anwendbar ist. Der größte Vorteil der Cre Rekombinase besteht darin, daß sie die sequenzspezifische Rekombination von DNA aufgrund von sehr kurzen loxP Erkennungssequenzen durchführen kann. Die loxP Sequenzen lassen sich mittels homologer Rekombina-

tion in dem zu untersuchenden DNA-Lokus inserieren. Aufgrund ihrer geringen Größe interferieren sie dabei nicht mit dem endogenen regulativen Schaltwerk. Das eigentliche Werkzeug, die regulierte Cre Rekombinase kann der geschickte Experimentator auf einem anderen Chromosom in sicherer Entfernung „ablegen“, so daß jegliche Interferenz mit dem Zielbereich vermieden wird.

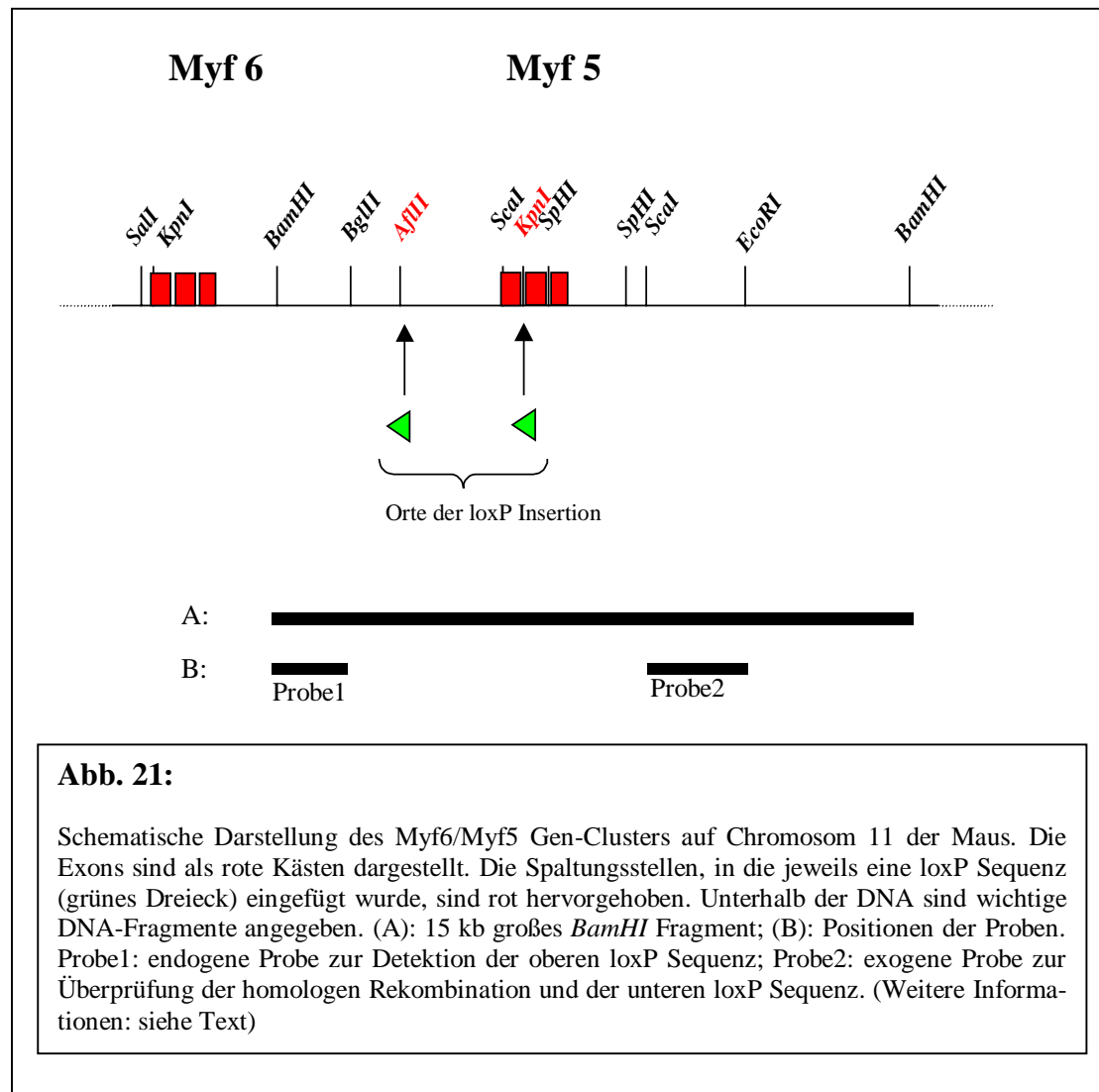
Im folgenden werden die Schritte geschildert, die zur Generierung eines geflochten Genortes führen. Die damit verbundenen Veränderungen wurden in embryonalen Stammzellen der Maus durchgeführt. Diese eignen sich für *in vitro* Manipulationen (siehe Abschnitt 3.1.7.), aber aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften nehmen diese Zellen auch eine wichtige Schlüsselposition bei *in vivo* Versuchen in der Maus ein.

3.2.1. Strategie zur Generierung der geflochten ES-Zelllinie/Übersicht

Die Wahl des zu analysierenden Gens fiel auf den myogenen Transkriptionsfaktors Myf5 (Braun et al., 1989). Seine konstitutive Ausschaltung via homologer Rekombination in ES Zellen führte zu einer Verzögerung der Myogenese und zu einem Defekt in der Rippenbildung, der schließlich in eine perinatale Letalität resultiert (Braun et al., 1992; 1994). Myf5^{-/-} Mäuse entzogen sich damit einer Analyse nach ihrer Geburt. Damit bleibt auch die Funktion von Myf5 während der Prozesse des Muskelaufbaus und der –regeneration vorerst im Dunkeln. Eine konditionelle Ausschaltung des Faktors während der späten Embryogenese oder im Juvenil-, bzw. Adultstadium könnte daher zur Klärung dieser Fragestellungen beitragen (siehe auch Einleitung und Diskussion).

Das Gen für Myf5 liegt auf dem Chromosom 11 der Maus, in enger Nachbarschaft mit einem weiteren Gen der myogenen Familie, Myf6 (Braun et al., 1990). Die Transkriptionsstartstelle des Myf6 Gens liegt ca. 8 kb „stromaufwärts“ des Myf5 Gens. Diverse Untersuchungen zur Regulation dieser Genorte haben das subtile Netzwerk, das diese Aufgabe übernimmt, näher beleuchten können (Olson et al., 1996; Zweigerdt et al., 1997). Oberhalb und unterhalb der drei Exons des Myf5 Gens liegen regulatorische Bereiche, die seine Expression in bestimmten Körperregionen steuern. Darüber hinaus haben weiter entfernt liegende Bereiche ebenfalls einen großen Einfluß auf die Myf5 Expression (Zweigerdt et al., 1997). So reagiert das Gen sehr empfindlich auf Störungen, die aufgrund von Insertionen in die weitere Umgebung seines Transkriptionsstartsignals vorgenommen werden. Im Extremfall führte die Inserierung eines Promotors in das 8 kb oberhalb von Myf5 gelegene Myf6 zu einer Abschaltung beider Gene (Braun et al., 1995). Bei der Modifikation der Myf5 Sequenzen mußte daher entsprechende Vorsicht angewandt werden, um eine ungestörte Expression des Gens zu gewährleisten. Der Myf5 Locus wurde so verändert, daß sein erstes Exon, das für alle wichtigen Domänen des Proteins kodiert, von loxP Sequenzen flankiert wurde (Abschnitt 3.2.2.). Dabei durfte die obere loxP Sequenz nicht in unmittelbarer Nähe des

Transkriptionsstartsignals inseriert werden, um Interferenzen mit dem basalen Promotor zu vermeiden. Daher wurde eine ca. 2 kb oberhalb des Myf5-Startsignals liegende *AflIII* Spaltungsstelle für die Insertion einer loxP-Sequenz ausgewählt. Innerhalb des Intron 1 erfolgte die Insertion der zweiten loxP-Sequenz in eine *KpnI* Spaltungsstelle. Beide loxP-Sequenzen wurden zur Wiedererkennung mit einer Spaltungsstelle kombiniert: Die obere loxP-Sequenz erhielt eine *EcoRI*-, die untere loxP-Sequenz eine *Clal*-Erkennungsspaltsungsstelle.



Die Insertion dieser loxP-Sequenzen wurde durch eine homologe Rekombination mit Hilfe eines Zielvektors (Abschnitt 3.2.2.1.) durchgeführt. Innerhalb des homologen Bereichs für die Rekombination befand sich eine Neomycin-Resistenzgen- und eine HSV-Thymidin-Kinase-Gen-Kassette, die ebenfalls von loxP-Sequenzen eingefasst war. Die Neomycin-Resistenzgen-Kassette wurde dabei für die Suche nach integrierten DNA-Sequenzen verwendet. Die Analyse der homologen Rekombinationsereignisse erfolgte mit einer exogenen Probe (ein *ScaI*-*EcoRI* Fragment) im Southern-Blot (Abschnitt 3.2.2.2.). Die Einbeziehung der oberhalb gelegenen loxP-Sequenz wurde mit einer endogenen *BamHI*-*BglII* Probe untersucht. Um die

regulativen Bereiche für die Selektionskassette aus dem *Myf5*-Lokus zu entfernen, wurde in homolog rekombinierten ES-Zellklonen transient die Cre-Rekombinase exprimiert (Abschnitt 3.2.2.3.). Die Cre/loxP rekombinierten Klone überstanden eine negative Selektion mit FIAU und wurden anschließend für die Injektion in Mäuse-Blastozysten verwendet.

Die Blastozysten wurden in Ammenmütter transferiert (Abschnitt 3.2.3.). Aus den erfolgreich injizierten Blastozysten entstanden chimäre Mäuse. Diese bildeten die Ausgangsbasis zur Zucht eines homozygot „geflochten“ *Myf5*^{loxP/loxP} Mäusestammes. Dieser wurde mit Cre exprimierenden Mäusen gekreuzt und zur Analyse einer Cre/loxP vermittelten Rekombination *in vivo* eingesetzt (Abschnitt 3.2.4.).

3.2.2. Modifizierung des *Myf5*-Lokus durch homologe Rekombination

Wie in 3.2.1 erwähnt wurde, wurde der *Myf5*-Lokus durch restriktionsenzymatische Spaltungen genau kartiert (Abb. 21), um Stellen für die Insertion der loxP Sequenzen zu ermitteln. Als geeignete Orte wurde eine *AflIII*- und eine *KpnI*-Spaltungsstelle gefunden (rot markiert in Abb. 21). Gleichzeitig wurden genomische Fragmente aus dem Lokus für eine Subklonierung für den Zielvektor ausgewählt: Dieses sind (a) ein *KpnI* x *AflIII* Fragment, das *Myf6* Sequenzen enthält; (b) ein *BamHI* x *KpnI* Fragment, das das Exon 1 von *Myf5* enthält und partiell überlappend mit (a) ist; sowie (c) ein *KpnI* x *SpHI* Fragment, das die Sequenzen für die Exons 2 und 3 von *Myf5* sowie weitere stromabwärts gelegene Sequenzen enthält.

3.2.2.1. Konstruktion des Zielvektors für die homologe Rekombination

Der Zielvektor für die homologe Rekombination basierte auf einer modifizierten Version von pGH1 (Gu et al., 1993), der wiederum von dem Vektor pGEM-7Zf(+/-) (Fa. Promega) abgeleitet wurde. Oberhalb der Selektionskassette und der einzigen loxP Sequenz wurde eine singuläre *XbaI* Schnittstelle gegen eine *PmeI* Spaltungsstelle ausgetauscht. Die Spaltung mit *PmeI* führte zur Linearisierung des späteren Zielvektors. Die *XhoI* Spaltungsstelle blieb unverändert und diente später zur Insertion des stromabwärts gelegenen homologen Bereiches aus der *Myf5* Sequenz. Dadurch war gewährleistet, daß die Transkriptionsrichtung der Gene der Selektionskassette in entgegengesetzter Richtung zum endogenen Gen erfolgte. Unterhalb der Selektionskassette wurde eine *HindIII* Spaltungsstelle gegen eine *AflIII*, und eine *SacI* Spaltungsstelle gegen eine *Sall* Spaltungsstelle ausgetauscht. Der entstandene Vektor diente als Rückrad für den Zielvektor und wurde pGPSA genannt.

Um die genomischen Fragmente mit einer loxP Sequenz zu versehen, wurden sie in die mit jeweils einer loxP Sequenz versehenen pBlueskriptKSII Derivate pLXE und pLXC subkloniert (Daten nicht gezeigt). Zur Generierung der stromaufwärtsgelegenen Fragmente [(a) und (b) im vorherigen Abschnitt] wurde der Vektor pHRCmyf6#19C mit *KpnI* und *AflIII* bzw.

BamHI und *KpnI* gespalten. Die genomischen Fragmente wurde isoliert, mit *KpnI* Linkern versehen und in den mit *KpnI* gespaltenen Vektoren pLXE bzw. pLXC subkloniert. Die entstandenen Konstrukte wurden pLXEG bzw. pLXCG genannt. Das Konstrukt pLXCG enthielt drei *AflII* Spaltungsstellen. Die oberhalb der *KpnI* gelegene *AflII* Spaltungsstelle wurde deletiert, um das Konstrukt pLXCGII zu erhalten. Zur Herstellung des stromabwärtsgelegenden Fragments [(c) im vorherigen Abschnitt] wurde der Vektor p(cos myf5 [*KpnI* x *EcoRI*] #7) *KpnI* x *EcoRI* gespalten. Das Insert wurde durch eine partiellen *SphI* Spaltung verkleinert und als *XhoI* Fragment in pBluescriptKSII kloniert. Dieses Konstrukt erhielt den Namen pdomy^{Xho2x}.

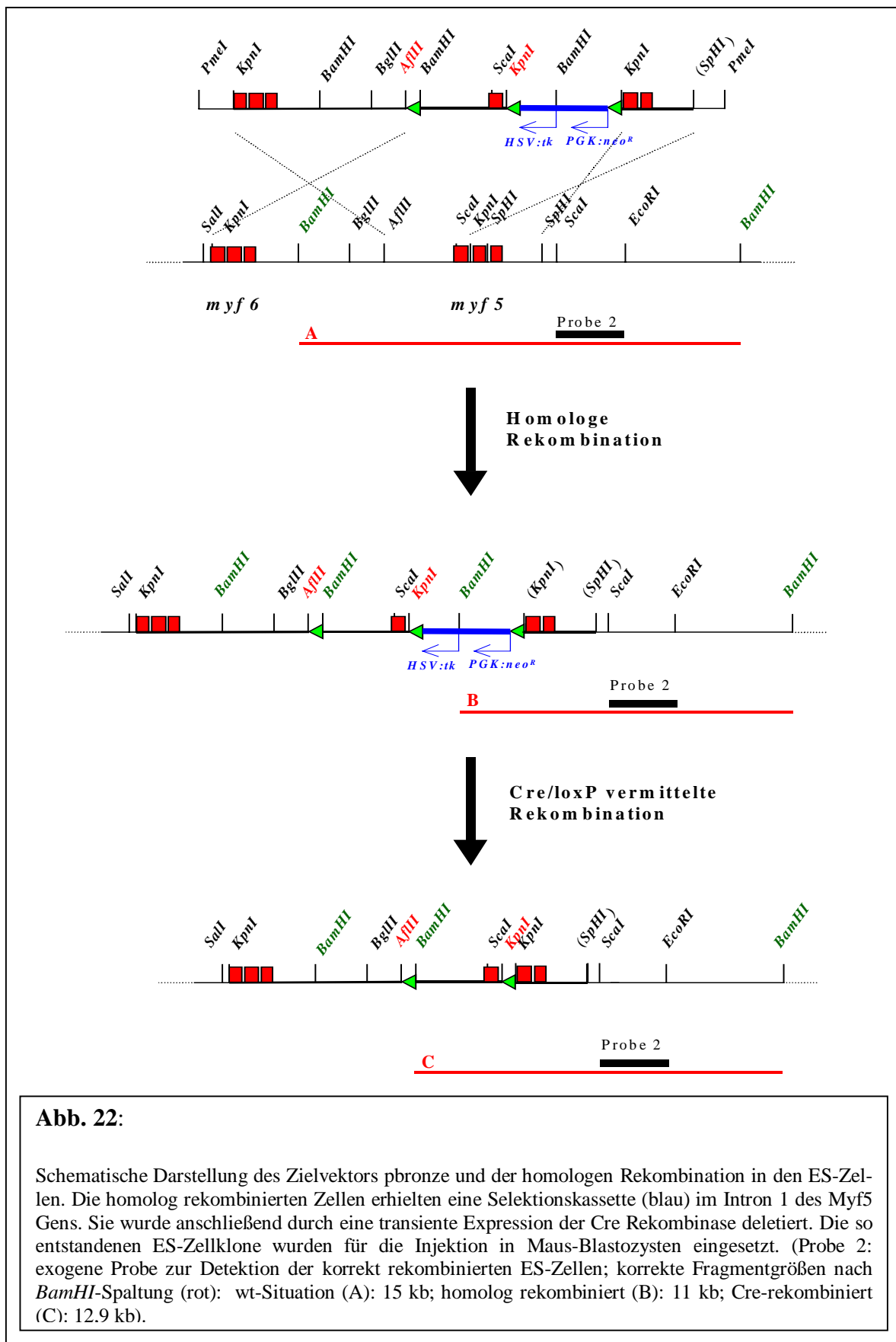
Der Zielvektor wurde dann aus den einzelnen Komponenten zusammengesetzt: Zunächst wurde der Vektor pGPSA mit *AflII* gespalten und mit dem *AflII* Fragment aus pLXCGII ligiert. Der entstandene Vektor hieß pGOLD. pGOLD wurde mit *XhoI* gespalten und mit dem entsprechenden Fragment aus pdomy^{Xho2x} ligiert. Das entstandene Konstrukt wurde pSilver genannt. pSilver wurde nun mit *Sall* gespalten und mit dem *Sall* Fragment aus pLXEG ligiert. Das Produkt wurde pbronze genannt und war der Zielvektor für die homologe Rekombination in ES-Zellen. Die Zwischenklonierungen zur Generierung des Zielvektors wurden mit Hilfe der Koloniehybridisierung durchgeführt. Er ist in Abb. 22 schematisch dargestellt.

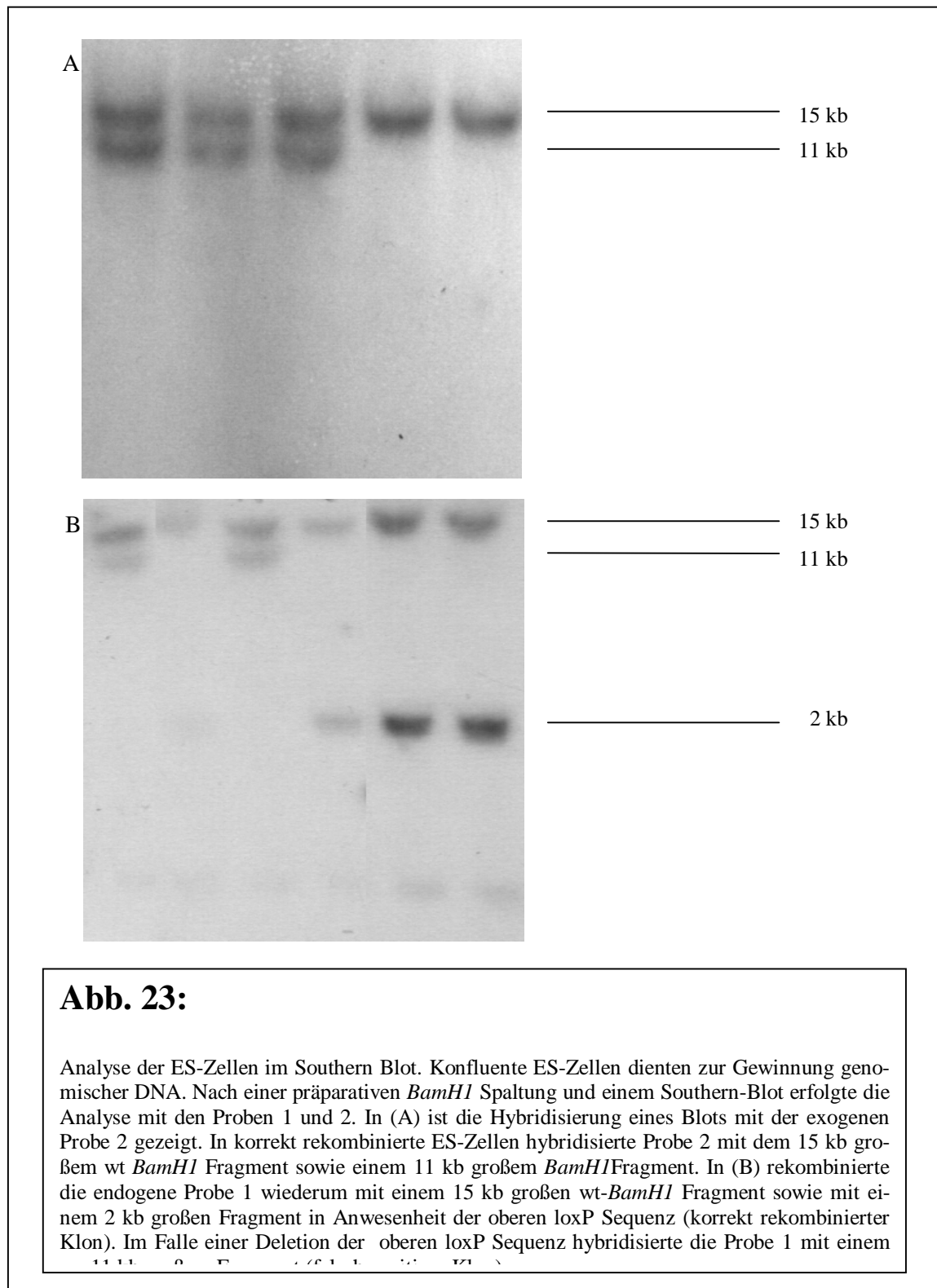
3.2.2.2. Elektroporation des Zielvektors in J1 ES-Zellen und Nachweis der homologen Rekombinations-Ereignisse

150 µg des mit *PmeI* linearisierten Vektors wurden für die Elektroporation von 1×10^8 J1 ES-Zellen verwendet. Die Zellen wurden anschließend auf 15 10cmØ Kulturschalen, die vorher mit 0,2 % Gelatine und embryonalen Feederzellen beschichtet wurden, ausgesät. 24 Stunden nach der Elektroporation begann die Selektion mit 0,4 mg/ml bis 0,6 mg/ml G418. Die Selektion wurde für ca. 10 Tage durchgeführt. Anschließend wurden die überlebenden Kolonien gepickt, subkultiviert und durch Southern Blot Analyse untersucht.

Bei einer korrekten homologen Rekombination erwartete man unter Verwendung der exogenen Probe 2 eine Verkleinerung des wt-*BamHI* Fragmentes von 15 kb auf 11 kb (Abb. 22, 23). Der stromaufwärtsgelegene homologe Bereich war mit ca. 9 kb sehr groß. Innerhalb dieser 9 kb lag mit einer singulären loxP Sequenz noch eine wichtige Modifikation vor. Um diese Veränderung in das endogene Gen einzufügen, durfte die entsprechende homologe Rekombination nur in den obersten 6 kb stattfinden. Wenn sie innerhalb der nächsten 3 kb erfolgen würde, läge zwar eine korrekte homologe Rekombination vor, allerdings würde dann die obere loxP Sequenz für eine konditionelle Ablation der DNA-Sequenz fehlen. Daher war der Einsatz der Probe 1 unbedingt notwendig, denn man erwartete ein Drittel falsch positiv re-

kombinierter ES-Zellklone. Die korrekt rekombinierten ES-Klone wiesen mit der Probe 1 eine Verkleinerung des 15 kb großen *Bam*HI Fragmentes auf ca. 2 kb auf.





Insgesamt wurden in zwei unabhängigen Elektroporationen 454 ES-Zellklone überprüft. Ein typisches Ergebnis aus dem Southern-Blot ist in Abb. 23 gezeigt. Von den 454 Zellklonen waren nach der Analyse mit der exogenen Probe 2 25 positiv. Die weitere Analyse dieser Klone mit Probe 1 zeigte, daß in allen Klonen eine Rekombination in den ersten 6 kb stattgefunden hatte, d.h. alle 25 Klone enthielten die gewünschte 5'gelegene loxP Sequenz (Tab. 5). Die Frequenz für eine homologe Rekombination von ca. 1:18 war relativ hoch, insbesondere,

wenn man bedenkt, daß lediglich eine positive Selektion durchgeführt worden war. Wahrscheinlich lag der Grund für die hohe Rekombinationsfrequenz in den relativ großen DNA-Bereichen, die für eine homologe Rekombination zur Verfügung standen.

Tabelle 5:		
Statistische Auswertung der homologen Rekombination von Myf5		
	Insgesamt	davon positiv mit Proben 1 und 2 (endogen und exogen)
Anzahl der untersuchten ES-Zellklone	454	25/454
Anteil	n.a.	0,06
Frequenz	n.a.	1:18
Die Analyse erfolgte nach der Hybridisierung von Southern-Blots mit den Proben 1 und 2 (weitere Einzelheiten: siehe Text).		

Mit der Probe 1 konnten von 277 getesteten nur insgesamt 28 falsch positive ES-Zellklone nachgewiesen werden, die innerhalb des Bereiches der äußeren loxP Sequenz rekombiniert hatten (Daten nicht gezeigt). Anstelle eines Drittels falsch positiver ES-Zellklone wurden damit nur ca. 10 % vorgefunden. Das bedeutet, daß homologe Rekombinationen bevorzugt in den äußeren Gebieten des homologen Bereiches stattfinden.

Mehrere positiv rekombinierten Klone wurden anschließend für die Injektion von C57/Bl6 Blastozysten verwendet (insgesamt drei: #101, #249, #283). Von den davon geborenen Tieren waren mehrere chimär zu unterschiedlichen Anteilen von ca. 50-100 %.

Die weitere Untersuchung der so generierten chimären Männchen wies auf eine abnormale Spermatogenese in diesen Tieren hin (Tab. 6). Diese führte dazu, daß selbst 100 % chimäre Mäuse nach einer Kreuzung mit C57/Bl6 Weibchen entweder keinen oder nur Nachwuchs mit schwarzer Fellfarbe hatten (C57/Bl6 Hintergrund/Die J1 ES-Zellen besitzen 129/Sv Hintergrund, man erwartete daher ein Agouti-farbenes Fell.). Die ES-Zellen schienen sich auch bei sehr hohen Chimerismus-Raten nicht an der Ausbildung der Keimbahn zu beteiligen. Dieser Prozeß schien sich autonom nur auf die Spermien-Entwicklung auszuwirken, da die Produktion von Wildtyp Spermien nicht beeinträchtigt war. Der Grund darin liegt wahrscheinlich in der Expression des Herpes Simplex Thymidin-Kinase Gens in der Keimbahn der chimären Mäuse. Dieses verursachte ein selektives Absterben der Vorläuferzellen der Spermien. Dieses

Phänomen ist bereits beschrieben und wurde in diesem Zusammenhang von mir bestätigt (Braun et al., 1990; Wilkie et al., 1991).

Tabelle 6:							
Nachkommen der $\text{Myf5}^{\text{loxP}(+/wt)\text{HSVtk}+}$ chimären Mäuse							
	Chimäre Mäuse	davon		Summe Nachkommen der m / w Chimären		davon agouti	
		♂	♀				
Anzahl insgesamt	9	7	2	137	5	0	0
Anzahl der sterilen Mäuse	3	2	1	0	0	0	0

Daher war eine Entfernung der Selektionskassette notwendig, bevor die ES-Zellen für die Generierung von chimären Tieren verwendet werden konnten.

3.2.2.3. Transiente Expression der Cre Rekombinase in den homolog rekombinierten $\text{Myf5}^{\text{loxP}(+/wt)\text{HSVtk}+}$ ES-Zellklonen

Die Entfernung der Selektionskassette wurde mit Hilfe der Cre Rekombinase durchgeführt. Die Selektionskassette des Zielvektors war mit loxP Sequenzen flankiert, so daß eine transiente Expression der Cre Rekombinase in der Deletion der Selektionskassette resultierte (Abb. 22).

30 µg Cre Rekombinase wurden mit Hilfe einer transienten Elektroporation in 1×10^7 ES-Zellen geschleust. Zwei homolog rekombinierte ES-Zellklone, #249 und #283, wurden so behandelt. 24 Stunden nach der Elektroporation schloß sich eine ca. 10 tägige Negativ-Selektion mit 1 x FIAU an. Die überlebenden Klone wurden wiederum gepickt, subkultiviert und analysiert. Insgesamt lagen der Cre Rekombinase drei loxP Sequenzen als Substrat vor. Deshalb wurden nach der erfolgten Cre-vermittelten Rekombination verschiedene Endprodukte erwartet. Die Rekombination fand aber innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne statt, so daß alle Zellen einer Kolonie den gleichen Genotyp aufwiesen. Die möglichen Endprodukte sind schematisch in Abb. 24 dargestellt. Eine Analyse der Klone ist in Abb. 25 abgebildet. Die statistische Auswertung erfolgt in Tabelle 7. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die Cre Rekombinase bevorzugt zwischen den beiden äußeren loxP Sequenzen rekombinierte (47,9 % zwischen loxP Sequenzen 1 und 3, 40,5 % zwischen loxP Sequenzen 2 und 3). Über 10 % aller ES-Zellklone waren aufgrund des hohen Selektionsdrucks aberrant rekombiniert. Von den 49 positiven Zelllinien wurden insgesamt 5, nämlich #249.38, #283.7, #283.11, #283.13 und #283.27 für die Injektion von Blastozysten verwendet.

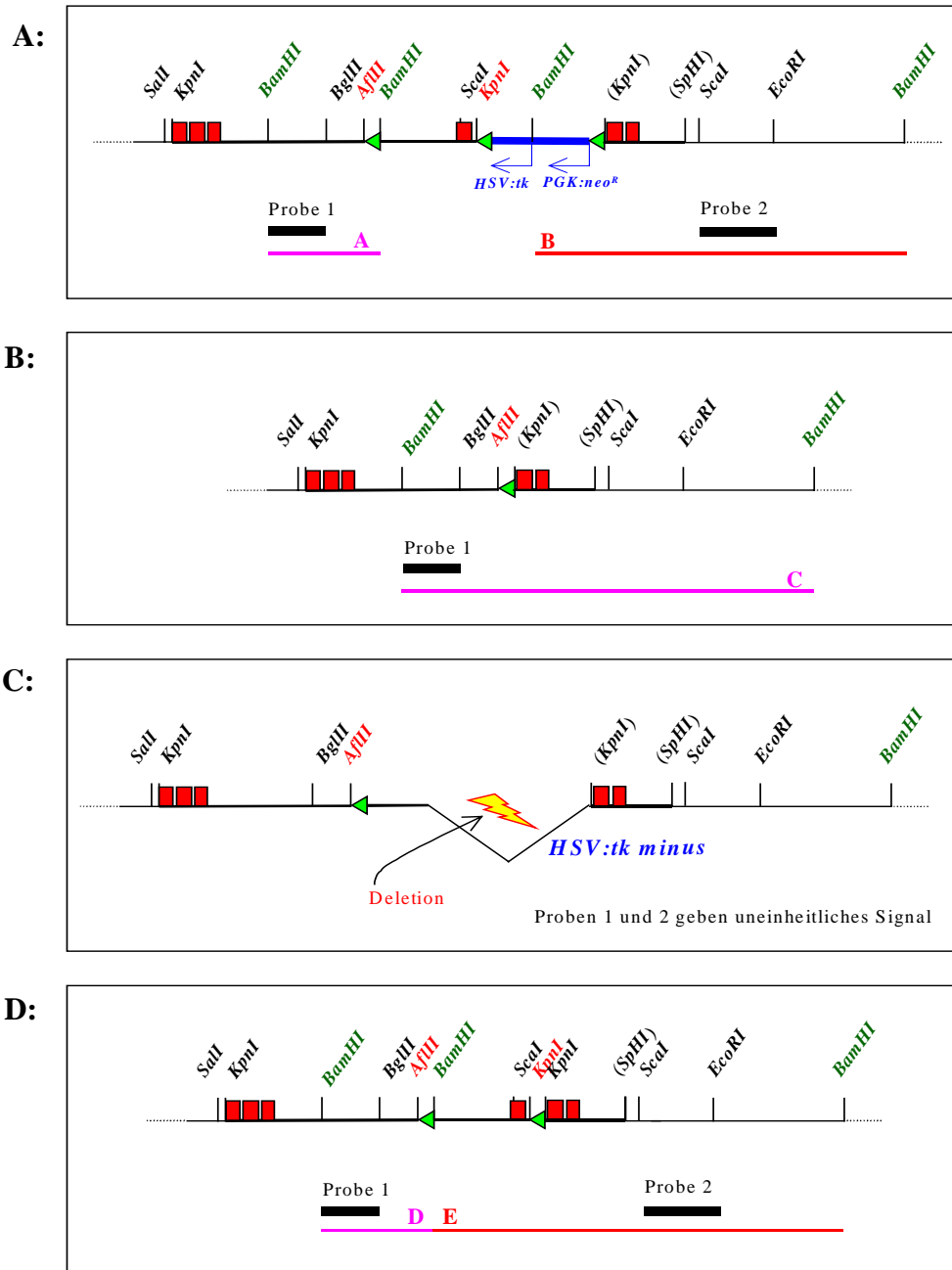


Abb. 24:

Schematische Darstellung der Cre/loxP vermittelten Rekombination. In (A) ist die Situation vor der Rekombination dargestellt: Probe 1 detektiert ein 2 kb großes *BamHI* Fragment, Probe 2 ein 11 kb großes *BamHI* Fragment. (B-D): Ergebnisse nach der Cre-vermittelten Rekombination. (B) falsch positiver Klon: Probe 1 detektiert ein ca. 11 kb großes Fragment (C): aberrante Rekombination/nicht Cre-vermittelt, große Deletionen. Die Proben detektieren uneinheitliche oder keine Fragmente. (D): korrekt rekombinierter ES-Klon: Probe 1 detektiert ein 2 kb großes Fragment (d), Probe 2 ein 12,9 kb großes Frag-

3.2.3. Generierung eines *Myf5^{loxP/loxP}* Mäusestamms durch Blastozysten-Injektion von ES-Zellen

Insgesamt fünf korrekt rekombinierte ES-Zellklone wurden für die Injektion von C57/Bl6

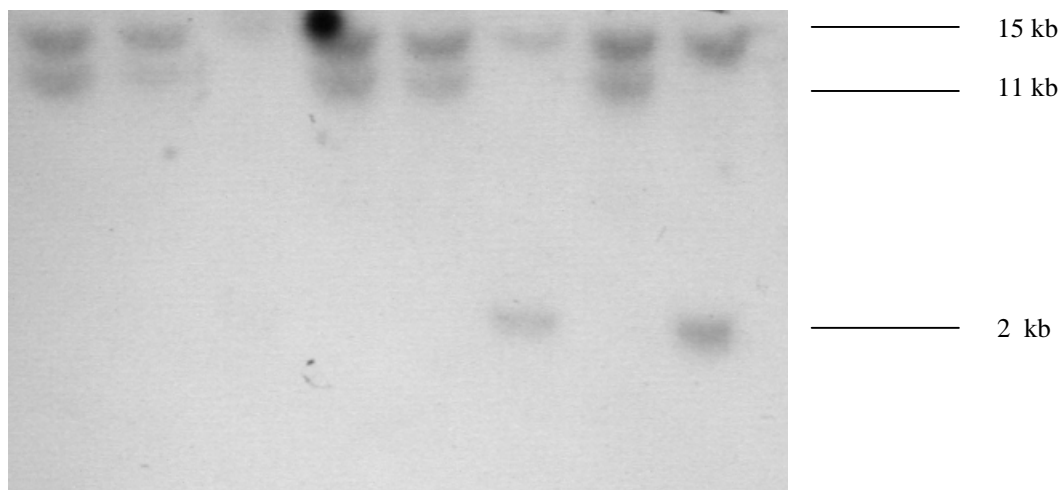


Abb. 25:

Analyse der Cre/loxP rekombinierten $Myf5^{loxP(+/-wt)}$ ES-Zellen im Southern Blot. Die ES-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde die DNA aus diesen Zellen gewonnen und mit *BamHI* gespalten. In dem anschließenden Southern-Blot und der Analyse mit den Proben 2 und 1 konnten die homolog rekombinierten Klone identifiziert werden. Die korrekte homologe Rekombination konnte durch die Hybridisierung der exogenen Probe 2 mit einem 12,9 kb großes Fragment nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die endogene Probe 1 lieferte ein Fragment von ca. 2 kb. Falsch positive Klone zeigten ein weit größeres Signal von ca. 11 kb.

Tabelle 7:

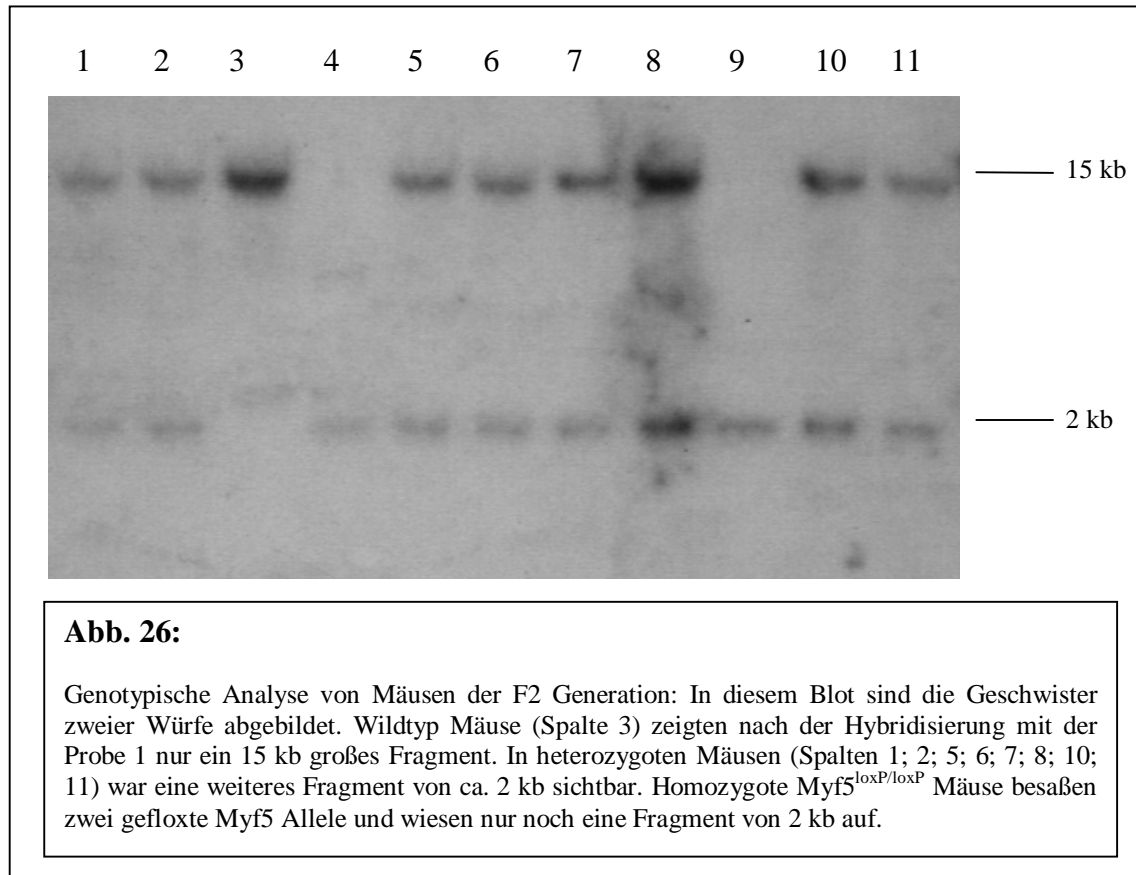
statistische Auswertung der Cre-vermittelten Rekombination von $Myf5^{loxP(+/-wt)HSVtk+}$

	Insgesamt	korrekt rekombiniert ($Myf5^{loxP(+/-wt)}$) (Abb. 25 D)	komplett rekombiniert ($Myf5^{\Delta Exon1}$) (Abb. 25 B)	Deletionen/ aberrante Rekombi- nationen (Abb. 25 C)
Anzahl der untersuchten ES-Zellklone	121	49/121	58/121	14/121
Anteil	100 %	40,5 %	47,9 %	11,6 %

Die Analyse erfolgte durch die Hybridisierung von Southern-Blots mit den Proben 1 und 2 (weitere Einzelheiten: siehe Text).

Blastozysten eingesetzt. Insgesamt wurden neun Injektionen durchgeführt. 30 Junge wurden nach den Transfers in Ammenmütter des Stammes B6D2F1 geboren. Von diesen waren 19 in unterschiedlichem Ausmaße chimär (15 Männchen und 4 Weibchen). Die weiblichen Chimä-

ren (1 x aus 283.7, 2 x aus #283.11, 1 x aus #283.13) waren hoch chimär in Bezug auf die Fellfarbe. Von den vier Weibchen waren jedoch drei steril und zeugten keine Nachkommen. Das andere Weibchen gebär nur Nachwuchs mit schwarzer Fellfarbe. Wahrscheinlich konnten sich die ES-Zellen, die einen XY-Genotyp besitzen, in diesem Fällen nicht an der Ausbildung der Keimbahn beteiligen. Von den Männchen waren ebenfalls zwei aus der ES-Zelllinie #283.11 hervorgegangene Chimäre steril.



Die restlichen 14 Mäusen zeugten 274 Junge. Drei chimäre Männchen (#283.7.81; #283.7.82; #283.13.80) transferierten den ES-Zell-Genotyp auf ihre Nachkommen. Insgesamt wurden von ihnen 59 Agouti-farbige Mäuse in der F1 Generation geboren. Davon waren 25 Nachkommen heterozygot für den $Myf5^{loxP/wt}$ Locus, was beinahe der theoretisch zu erwartenden Zahl von 50 % nahe kommt. Insgesamt fünf heterozygote $Myf5^{loxP/wt}$ Männchen wurden mit 15 heterozygoten $Myf5^{loxP/wt}$ Weibchen verpaart. Unter den Nachkommen der F2-Generation befanden sich homozygote $Myf5^{loxP/loxP}$ Mäuse (Abb. 26, Tabelle 8). Die Mäuse waren phänotypisch unauffällig und unterschieden sich nicht von ihren Heterozygoten oder Wildtyp Geschwistern. Die statistische Auswertung der F2-Generation erfolgt in Tabelle 8. Insgesamt wurden 90 Mäuse untersucht. Davon waren 27 $Myf5^{wt/wt}$, 47 heterozygot $Myf5^{loxP/wt}$ sowie 16 homozygot $Myf5^{loxP/loxP}$. Das entspricht einem Verhältnis von 0,9:2,0:0,5. Damit wurden weniger homozygote $Myf5^{loxP/loxP}$ Mäuse geboren wie erwartet. Allerdings ist die Anzahl der untersuchten Mäuse nicht groß genug, um eine daraus eine Schlußfolgerung bzgl. der Überle-

bensrate der homozygoten $\text{Myf5}^{\text{loxP/loxP}}$ Mäuse zu ziehen. Wären nur fünf weitere $\text{Myf5}^{\text{loxP/loxP}}$ Mäuse geboren, wäre das Verhältnis bereits ausgeglichen.

Tabelle 8:

statistische Auswertung der Mäuse der F2 Generation

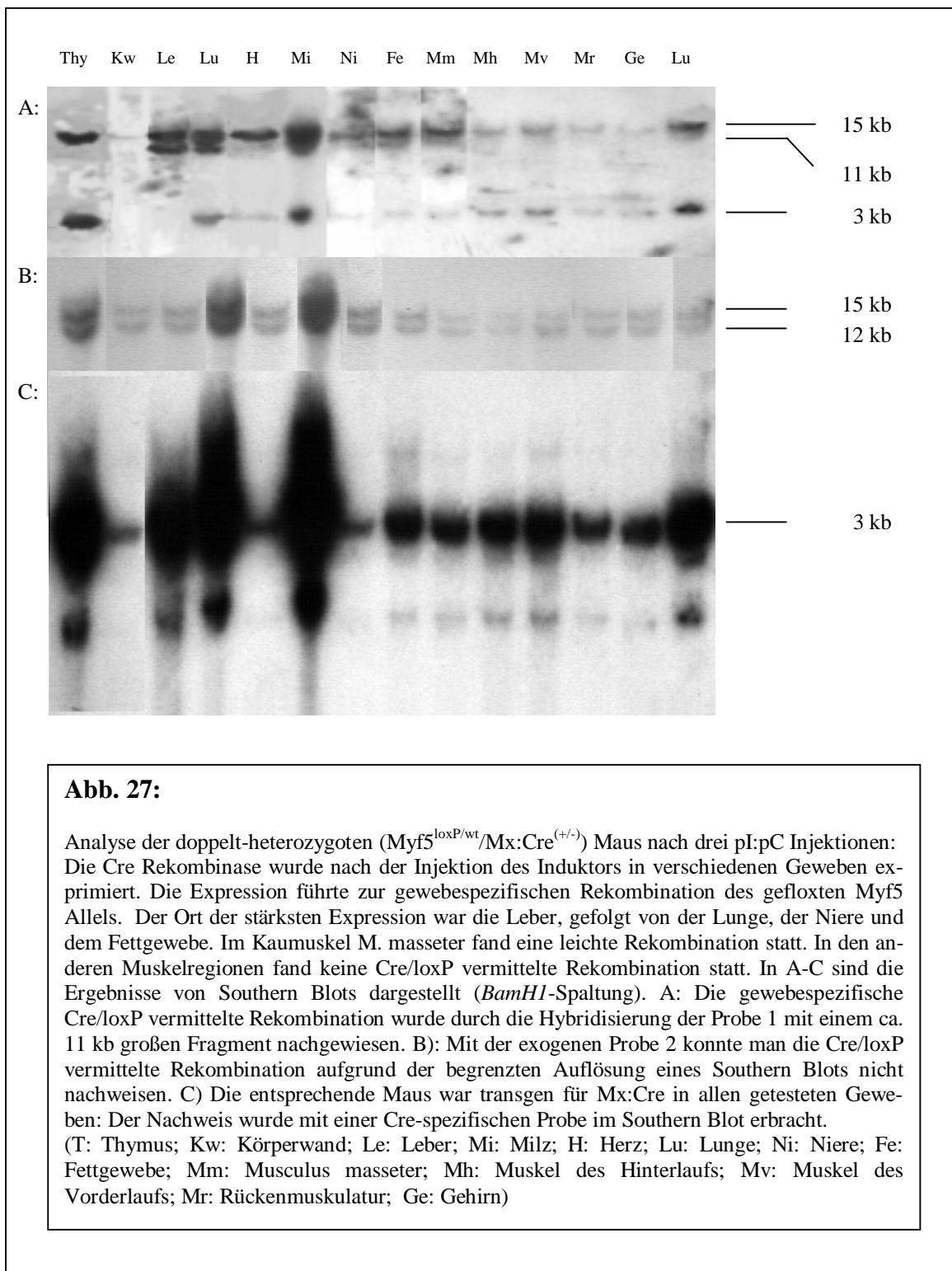
	Insgesamt	Wildtyp $\text{Myf5}^{\text{wt/wt}}$	Heterozygot $\text{Myf5}^{\text{loxP/wt}}$	Homozygot gefloxt $\text{Myf5}^{\text{loxP/loxP}}$
Anzahl der untersuchten Mäuse der F2 Generation	90	27	47	16
Anteil	100 %	30 %	68,2 %	17,8 %
Die Analyse erfolgte durch die Hybridisierung von Southern-Blots mit den Proben 1 und 2 (weitere Einzelheiten: siehe Text).				

Damit läßt sich als Fazit festhalten, daß die im Rahmen dieser Arbeit gewählte Strategie zur Insertion von loxP Sequenzen in „unsensible“ Bereiche der Myf5 Genregulation erfolgreich gewesen war. Die geflochtenen $\text{Myf5}^{\text{loxP/loxP}}$ Mäuse wiesen keine abnormale Rippenentwicklung auf und überlebten daher die Geburtsphase. Damit steht mit den $\text{Myf5}^{\text{loxP/loxP}}$ Mäusen ein Stamm für eine konditionelle Ausschaltung des Myf5 Gens und somit für die funktionelle Analyse von Myf5 während der Adultstadien der Maus zur Verfügung.

3.2.4. Test des $\text{Myf5}^{\text{loxP}(+/wt)}$ Mäusestamms *in vivo* durch Kreuzung mit Mx:Cre transgenen Mäusen

Um die Funktionalität der loxP Sequenzen *in vivo* zu testen, wurde ein $\text{Myf5}^{\text{loxP}(+/wt)}$ Weibchen mit einem Mx:Cre^(+/+) transgenen Männchen (Kühn et al., 1995) verpaart. Aus dieser Kreuzung gingen drei doppelt-heterozygote ($\text{Myf5}^{\text{loxP}(+/wt)}/\text{Mx:Cre}^{(+/-)}$) Weibchen hervor. Eines davon erhielt jeweils im Abstand von zwei Tagen jeweils drei intraperitoneale Injektionen von 300 µg p(I):p(C), eines Induktors für den Mx Promotor. Nach weiteren zwei Tagen wurde die Maus seziiert und verschiedene Gewebeproben entnommen. Diese wurden durch eine Southern Blot Analyse untersucht, um Aufschluß über die Orte und den Grad der Cre-vermittelten Rekombination zu erhalten.

Dabei konnte der Nachweis der gewebespezifischen Rekombination *in vivo* und damit die Funktionalität der loxP Sequenzen, die den Myf5 Genlokus flankierten, erbracht werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 27 dargestellt. Die Cre/loxP vermittelte Rekombination fand in Ab-



hängigkeit von dem Expressionsmuster des Transgens nach seiner Aktivierung statt. Der Ort der stärksten Transgen Expression war die Leber, wo auch die höchste Rekombinationsrate nachgewiesen werden konnte. Hier fand eine 100 %-ige Umsetzung des „geflochten“ Myf5 Allels statt. Mit der endogenen Probe 1 konnte nur noch das rekombinierte *BamHI* Fragment von einer Größe von 11 kb nachgewiesen werden (Abb. 27a). Das kleinere geflochte Fragment verschwand vollständig. In den anderen Geweben fand lediglich eine partielle Rekombination statt. Orte mit nachgewiesener Cre/loxP vermittelter Rekombination waren die Lunge, die

Niere, das Fettgewebe sowie zu einem geringen Anteil der Kaumuskel *Musculus masseter*. In den weiteren Geweben und in anderen getesteten Muskeltypen fand keine Cre/loxP vermittelte Rekombination statt.

Die Rekombination war nicht von dem Expressionszustand des Myf5 Gens abhängig. In den Geweben der hauptsächlichen Cre-Aktivität war das Gen zum Zeitpunkt der Deletion inaktiv. Sie hing vielmehr vom endogenen Expressionsprofil des Mx Promotors ab, der die Cre Rekombinase steuerte. Die von mir ermittelten Orte der Rekombination stehen daher auch in Übereinkunft mit den bereits publizierten (Kühn et al.; 1995). Einzige Ausnahme bildet die Milz, wo in der Originalpublikation eine starke Rekombination feststellbar war. Allerdings überstrahlte das sehr starke Signal der Wildtyp-Bande für dieses Gewebe das Rekombinationssignal in der Milz. Kürzere Expositionsdaten wiesen zumindestens eine partielle Rekombination in der Milz nach (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß das gefloxt Myf5 Allel *in vivo* seine Funktion erfüllen kann, d.h. die eingefügten loxP Sequenzen beeinflussen nicht die Expression des endogenen Myf5 Gens. Zudem wurde *in vivo* eine induzierbare, gewebespezifische Rekombination durch die Kreuzung mit einem entsprechendem Cre-Stamm nachgewiesen, d.h. die zwischen den loxP Sequenzen liegenden DNA-Bereiche wurden deletiert und inaktivierten so das Myf5 Gen. Mit der Etablierung eines Myf5^{loxP/loxP} Mäusestammes ist eine wichtige Voraussetzung für die Generierung eines konditionellen „Knock-Outs“ in der Maus geleistet worden.

4. Diskussion

4.1. Überblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Studien zur Etablierung eines Zelltyp-spezifischen und zeitlich regulierbaren Rekombinationssystems in Mäusen *in vivo* durchgeführt. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag in der Generierung und Testung eines neuartigen Transaktivatorsystems, das transkriptionelle und posttranslationale Elemente zur Regulierung der Cre Rekombinase in sich vereint. Der zentrale Bestandteil dieses Steuerungssystems war der nukleäre Hormonrezeptor für das Häutungshormon Ecdyson (EcR; Koelle et al, 1991) aus *D. melanogaster*. Er ist ein Mitglied der nukleären Rezeptor-Superfamilie, die ca. 200 Mitglieder besitzt. Durch Zugabe der exogenen Liganden Muristerone A bzw. Ponasterone A konnte das kombinierte Steuerungssystem zur Aktivierung der Cre Rekombinase (Austin et al., 1981; Sternberg und Hamilton, 1981; Sauer und Henderson; 1988) genutzt werden. Die Messung der Cre Rekombinasen Aktivität erfolgte transient mittels eines von loxP Sequenzen flankierten (geflochten) β -Galaktosidase Reporterkonstruktes (Kellendonk et al., 1996) und in stabilen Zelllinien mittels Selektion und Southern Blot Analyse. Die Wirksamkeit dieses Transaktivatorsystems wurde *in vitro* in transienten und stabilen Transfektionen in etablierten Zellkulturlinien und in ES-Zelllinien nachgewiesen.

Ein weiterer Schwerpunkt lag in der konditionellen Inaktivierung des Myf5 Gens (Braun et al., 1989) *in vivo* in der Maus. Zunächst wurden mittels homologer und Cre vermittelter Rekombination embryonale Stammzellen generiert, die ein gefloxtes Myf5 Allel besaßen. Sie stellten den Ausgangspunkt für die Züchtung von homozygot geflochten Myf5 Mäusen dar. Mit Hilfe eines transgenen Mäusestamms, in dem die Cre Rekombinase unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotor exprimiert wurde (Kühn et al., 1995), gelang der Nachweis einer Rekombination *in vivo*. Die Aktivierung der Cre Rekombinase führte zu einer zeitabhängigen und Gewebe-spezifischen Rekombination des Myf5 Gens *in vivo*.

4.2. Funktionelle Genanalyse *in vivo* in Mäusen: der konditionelle „Knock-Out“

Mit der Etablierung von Protokollen zur Generierung von „Knock-Out“ Mäusen war der Molekularbiologie ein wichtiges Werkzeug in die Hand gegeben, um die Funktion spezifischer Gene *in vivo* Säugetieren zu analysieren. Seit Ende der 80 Jahre wurden verschiedene Gene auf diese Weise untersucht. Sehr schnell stellte sich aber heraus, daß die Methode bei einigen Genen nur bedingt einsetzbar war (siehe Einleitung). So verbot sich eine „Knock-Out“ Analyse von wichtigen „house-keeping“ Genen und Strukturgenen von vorne herein, da ihr Fehlen zu einem Zusammenbruch biochemischer Synthesewege führte, die schon für eine einzelne Zelle unentbehrlich waren (Copp, 1995). Andererseits konnte gezeigt werden, daß

bestimmte Gene, die essentielle Aufgaben in Biosynthesen der Zellen übernahmen, zugleich auch von entwicklungsbiologischer Relevanz waren.

Die konstitutive Ausschaltung diverser Gene, deren Expressionsprofil auf eine spezielle Aufgabe in bestimmten Gewebetypen schließen ließ, resultierte oftmals in einem letalen Phänotyp (Copp, 1995). Dieser Umstand ließ die konstitutive Ausschaltung eines einzelnen Genes in einem Gesamtorganismus schon bald als einen zu groben Eingriff erscheinen.

Benötigt sind Mechanismen, die eine konditionelle Inaktivierung von einzelnen Genen in einzelnen Geweben oder Zelltypen zu bestimmten Zeitpunkten erlauben. Ein Ansatz basiert auf die Inaktivierung von Genen mittels sequenzspezifischer Rekombinasen wie Cre oder Flp (Übersichtsartikel: Kilby et al., 1993; Spencer, 1996; Porter, 1998). Dazu wird zunächst das entsprechende Zielgen mit den Zielsequenzen der Rekombinasen flankiert. Anschließend können Mäusestämme, die homozygot für ein derartig markiertes Gen sind, mit Cre exprimierenden Mäusestämmen gekreuzt werden. In der F1-Generation dieser Kreuzungen werden Mäuse gezeugt, die eine Cre bzw. Flp spezifische Rekombination beider Allele eines bestimmten Gens besitzen. Das Ausmaß der Rekombination ist im Prinzip nur von dem Expressionsprofil der Cre Rekombinase abhängig.

Bis heute wurden sequenzspezifische Rekombinasen hauptsächlich von konstitutiven bzw. gewebespezifischen Promotoren exprimiert. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die bis heute eta-

Tabelle 9: Übersicht über Mäusestämme, die sequenzspezifische Rekombinasen Gewebe- und/oder Zelltyp-spezifisch exprimieren			
Mausstamm	Expressionsort	Induzierbarkeit / Bemerkungen	Referenz
Ad(hCMV:Cre)	Leber, Herz, Pankreas, Darm, Lunge, Muskel,...	nein / Adenovirus	Rohlmann et al., 1996; Akagi et al., 1997
Ad(HSVtk:Cre)	Leber; Milz >Niere; Herz; Lunge / CNS	nein / Adenovirus	Wang et al., 1996
aP2:Cre	Fettgewebe	nein	Barlow et al., 1997
CD19:Cre	B-Zellen	nein	Rickert et al., 1997
CMV:Cre-ER	granuläre Zellen der Epidermis	ja: Tamoxifen	Brocard et al., 1997
Elfla:Cre	Präimplantations-Embryo	nein / Adenovirus	Lakso et al., 1996

Tabelle 9: Forts.

En2:Cre	Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze	nein	Zinyk et al., 1998
E _μ /P _{SV40} :CreER	B-Zellen	ja / Tamoxifen/ ER=ER(LBD)[G521R]	Schwenk et al., 1998
hCMV:Cre („Deleter“)	ubiquitär; Prä-Implantations Phase	nein / X-linked	Lasko et al., 1992 Schwenk et al., 1995
IRBP:Cre	Retina	nein	Akagi et al., 1997
lck:Cre	T-Zelllinie	nein	Orban et al., 1992 Gu et al., 1994
MLC2 ^v Cre k.i.	Ventrikuläre Muskelzelllinie	nein / „Knock In“	Chen et al., 1998
MMTV(LTR):Cre	Mamma; Lunge; Herz; Niere; CNS; Milz; Muskel	nein	Wagner et al., 1997
Mx: Cre	gewebespezifisch: Leber; Milz; Duodenum, ...	ja: IFN α /β; pI:pC	Kühn et al., 1995
m α A:Cre	Augenlinse, Embryonalstadium	nein / m α A=m α A Crystallin Promotor	Lasko et al., 1992
Nestin:Cre	ubiquitär, aber nicht 100% pro Gewebe	nein / zwei verschiedene transgene Linien	Betz et al., 1996
P0:Cre	Schwann Zellen	nein	Akagi et al., 1997
POMC:Cre	Hypophyse	nein	Akagi et al., 1997
Protamine1:Cre	männliche Keimbahn	nein	O’Gorman et al., 1997
WAP:Cre	Sekretorisches Epithelium der Mamma	nein / schwache Aktivität im CNS	Wagner et al., 1997
Zp3:Cre	Oozyten	nein	Lewandoski et al., 1997
human β -actin:Cre	ubiquitär in Blastozyste	nein	Lewandoski und Martin, 1997
human β -actin:Flp	ubiquitär in Blastozyste	nein	Dymecki et al., 1996
α CaMKII:Cre	Cortex; Hippocampus	nein	Tsien et al., 1996
TetO:Cre	ubiquitär	Ja / Tet-System; (CMV:tTA); Tetracyclin => inaktiv	St-Onge et al., 1996

blierten Mäusestämme.

Wie man Tabelle 9 entnehmen kann, waren die bisher generierten Mäusestämme, die bis auf eine Ausnahme die Cre Rekombinase transgen exprimieren, nicht universal für jede funktionelle Genanalyse verwendbar. Vielmehr mußte bislang jedes markierte Gen mit verschiedenen Cre-Mäusestämme gekreuzt werden, um die Funktion des Gens in spezifischen Zelltypen oder Geweben zu analysieren. Wünschenswert wären jedoch Mäusestämme, in denen der Expressionort und –zeitpunkt nicht durch den Promotorkontext unveränderlich vorgeben wäre. Die Verwendung von induzierbaren Promotoren würde die Steuerung des Zeitpunktes der sequenzspezifischen Rekombination ermöglichen. Durch die Zugabe des Induktors könnte die Cre Rekombinase zu irgendeinem beliebigen Zeitpunkt innerhalb des Expressionszeitraums eines Gens aktiviert werden.

Einer der bis heute verfügbaren induzierbaren Cre-Mäusestämme steuert die Cre Rekombinase mit Hilfe des murinen Mx1-Promotors (Kühn et al., 1995). Dieser Promotor ist in gesunden Mäusen inaktiv und läßt sich spezifisch durch Zugabe von IFN α , IFN β oder synthetischer doppelsträngiger RNA [Polyionisin-Polycytidinsäure (pI:pC)] induzieren. Allerdings ist die Aktivierung der Cre Rekombinase gewebespezifisch: Die höchsten Induktionen werden in der Leber, in der Milz und im Duodenum erzielt, während die Induktion im Skelettmuskel eher gering ist (Kühn et al., 1995; diese Arbeit). Zudem sind hohe IFN α Gaben toxisch für die Maus, wenngleich eine dreimalige Injektion von 300 μ g pI:pC noch keine sichtbare Beeinträchtigung der injizierten Maus hervorrief (Daten nicht gezeigt).

Andere induzierbare Mäusestämme exprimieren eine Cre-Östrogen-Rezeptor Fusion unter spezifischen gewebespezifischen Promotoren [CMV:CreER (Brocard et al., 1997); E μ /P_{SV40}:CreER (Schwenk et al., 1998)]. Der Östrogen-Rezeptor trägt die Mutation G521R, was ihn relativ unsensitiv gegenüber endogenes Östrogen macht. Als Induktoren wirken hier Tamoxifen bzw. Raloxifen. Allerdings sind beide Steroide in hohen Dosen toxisch und wirken abortiv.

Ein weiterer Mäusestamm reguliert die Cre Rekombinase mit Hilfe des Tet Systems (St-Onge et al., 1996). Dieses System hat jedoch den Nachteil, daß stete Gaben eines Antibiotikums notwendig sind, um eine Aktivierung der Cre Rekombinase durch die TetR/VP16 Fusion (Gossen und Bujard, 1992) zu verhindern.

Optimal wäre ein System, daß eine Zelltyp-spezifische und zeitlich abhängige Induktion der Cre Rekombinase zuließe. Diese Induktion sollte innerhalb eines bestimmten Gewebetyps und innerhalb eines kleinen Zeitraums möglichst gleichmäßig sein. Zudem sollte der exogen zugegebene Induktor möglichst keine toxische Nebenwirkungen zeigen.

Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Strategie zur Zelltyp-spezifischen und zeitlich abhängigen Expression der Cre Rekombinase zielte genau auf die Erfüllung dieses Anspruchs. Dabei wurden unter Verwendung des Ecdyson-Rezeptor aus *D. melanogaster* (Koelle et al., 1991) transkriptionelle und posttranslationale Kontrollelemente zu einem Kombinationssystem zusammengefaßt, um die Aktivität der Cre Rekombinase zu regulieren. Der Ecdyson-Rezeptor Anteil des Regulationssystems war zunächst inaktiv und ließ sich erst nach der Zugabe der exogenen Liganden Muristerone A oder Ponasterone A aktivieren. Beide Steroide sind Derivate des nativen Rezeptor-Liganden Ecdyson, verhalten sich in Säugetieren inert und zeigen keine toxischen Nebenwirkungen.

Bevor mein Steuerungssystem in Einzelheiten genauer diskutiert wird, soll zunächst ein Überblick über die Eigenschaften und Funktionen der Ecdyson-Rezeptors gegeben werden.

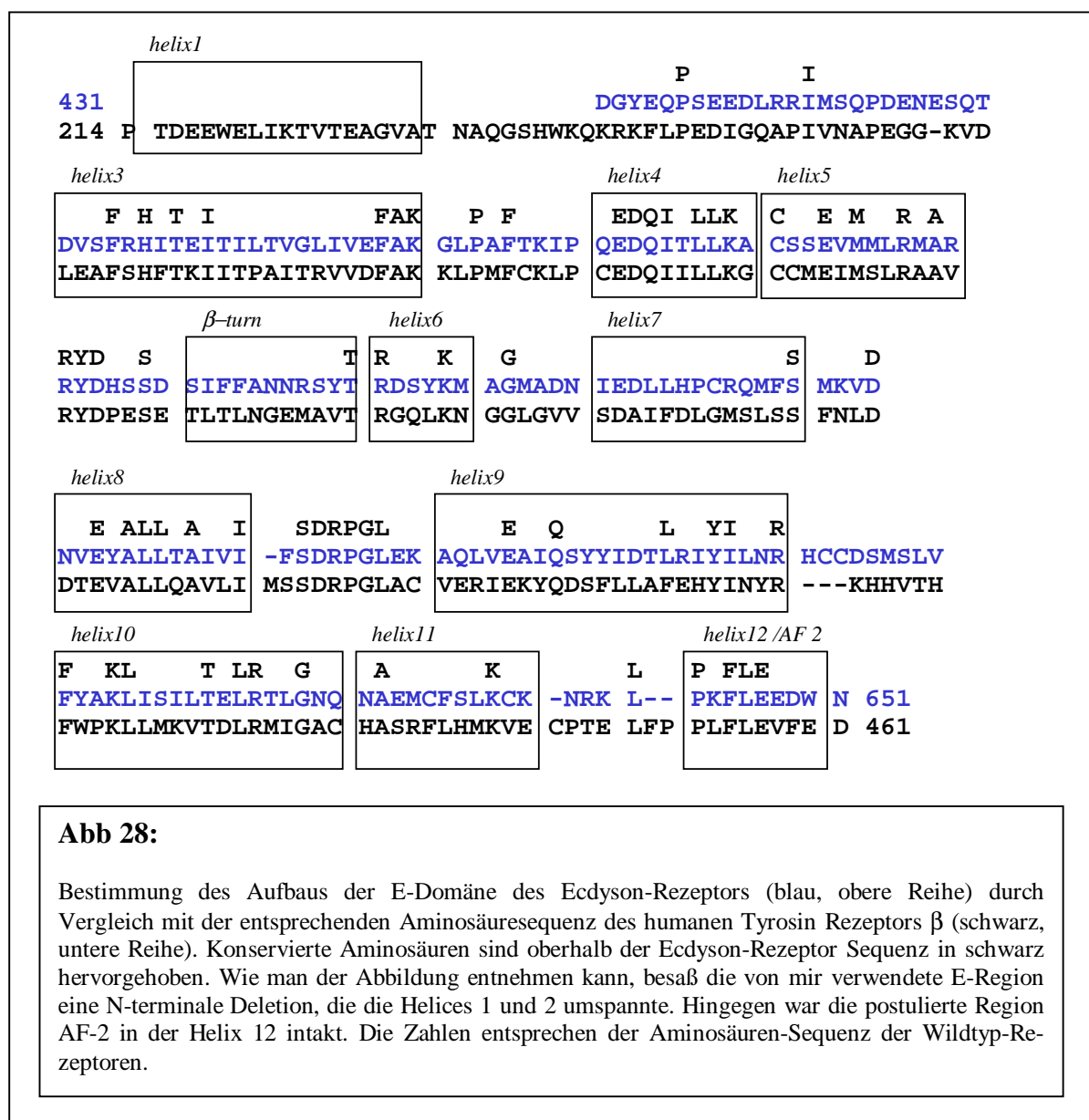
4.3. Der Ecdyson-Rezeptor: Ein Mitglied der nukleären Rezeptor-Superfamilie

Der Ecdyson-Rezeptor gehört zu der Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Diese Genfamilie umfaßt ca. 200 Mitglieder von den Arthropoden bis zu den Vertebraten (Übersichtsartikel: Evans, 1988; Kastner et al., 1995; Thummel, 1995; Mangelsdorf und Evans, 1995; Beato et al., 1995). Aufgrund des Vorkommens in diesen evolutionär sehr entfernt verwandten Tierstämmen muß das nukleäre Rezeptor-Urgen vor mindestens 550 Millionen Jahren in ihrem gemeinsamen Vorläufer existiert haben (Bourguet et al., 1995; Laudet et al., 1992). Die Mitglieder dieser Familie sind zumeist an Prozessen der Übertragung von exogenen Signalen in den Nukleus involviert. Viele binden exogene Liganden, jedoch besitzen viele keinen bekannten, sezernierten Liganden und werden daher als Orphan-Rezeptoren bezeichnet. So existieren in *Drosophila* bisher 16 Mitglieder der nukleären Rezeptor Superfamilie (Thummel, 1995). Der Ecdyson-Rezeptor ist dabei der einzige nukleäre Rezeptor in *Drosophila*, dessen Ligand bekannt ist. Die Liganden der anderen Rezeptoren sind entweder unbekannt, oder die Proteine (wie *knirps*) besitzen keine Hormonbindungsdomäne (HBD). Der Ecdyson-Rezeptor wird in drei verschiedenen Splice-Varianten exprimiert, die sich in der Verwendung verschiedener N-Termini voneinander unterscheiden (Talbot et al., 1993). Die Isoform EcR-B1 entspricht dabei der ursprünglich publizierten und von mir verwendeten cDNA (Koelle et al., 1991). Aus evolutionärer Sicht ist der Ecdyson-Rezeptor aus einer Kombination von Genduplikation und Exon-Shuffling hervorgegangen, da die einzelnen Domänen (siehe unten) unterschiedliche evolutionäre Ursprünge besitzen (Laudet et al., 1992). Der Ecdyson-Rezeptor besitzt keinen direkten Verwandten unter den Vertebraten. Die höchsten Homologieraten existieren in dem Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) mit 34 % identischer und 59 % ähnlicher Aminosäure-Sequenz innerhalb der Hormonbindungsdomäne (Forman et al., 1995). FXR bindet bevorzugt an Metabolite des Mevalonat-Stoffwechsels (z.B. an Farnesol). Darüber hinaus bindet er *in vitro* mit noch höherer Affinität an das Juvenil-Hormon JHIII aus *Drosophila*. Über Kreuzreaktionen mit dem Ecdyson-Rezeptor ist nichts bekannt (Forman et al., 1995).

Vor ihrer Aktivierung sind die Rezeptoren in der Regel cytoplasmatisch lokalisiert. Dort können sie einem Komplex mit dem HSP90 Protein ausbilden (Picard et al., 1988). Der Ecdyson-Rezeptor scheint aber zu denjenigen Familienmitgliedern zu gehören, die keine Interaktion mit *Heat Shock Proteinen* eingehen (Picard, 1994). Nach ihrer Aktivierung, die durch die Bindung eines spezifischen Liganden induziert wird, homo- oder heterodimerisieren die Rezeptoren mit- bzw. untereinander und können dann in den Nukleus transferieren. Dabei scheinen die Steroidhormon-Rezeptoren gemeinhin zu homodimerisieren, während die nicht steroiden Rezeptoren eher heterodimerisieren. Eine interessante Ausnahme bildet wiederum der Ecdyson-Rezeptor, der als einziger bekannter Steroid-Rezeptor ein Heterodimer nach seiner Aktivierung formiert, was mit seinem evolutionärem Chimerismus erklärt werden kann. Als Heterodimerisierungsfaktoren können spezifische oder ubiquitär exprimierte nukleäre Rezeptoren in Frage kommen. Der aktive Ecdyson-Rezeptor besteht aus einem Heterodimer aus dem eigentlichen Ecdyson-Rezeptor und dem Co-Rezeptor Ultraspiracle (USP; Yao et al., 1992; 1993; Thomas et al., 1993). Letzterer gehört zu der Klasse der Orphanrezeptoren und ist das *Drosophila* RXR-Homolog (Oro et al., 1990). Aus der jüngsten Zeit gibt es Hinweise, daß er in der Tat ein Rezeptor für das Juvenilhormon JHIII aus *Drosophila* sein könnte (Jones und Sharp, 1997). Der Ecdyson-Rezeptor kann *in vitro* auch Heterodimere mit anderen Rezeptoren wie mit einem der Rezeptoren RXR α - γ formen (Thomas et al., 1993; Yao et al., 1993). Die Interaktion ist in jedem Falle für die Ligandenbindung wichtig, da der Ecdyson-Rezeptor als Monomer oder Homodimer in seiner nativen Konformation nur schlecht Ecdyson bindet (Yao et al., 1993).

Die Mitglieder der nukleären Rezeptoren sind aus kleinen hoch konservierten Modulen oder Domänen, denen jeweils eine spezifische Aufgabe zugeordnet werden kann, zusammengesetzt. Diese Entdeckung führte schon bald in die Aufteilung der Rezeptoren in die Domänen A-F. Die A-Domäne und ein Teil der E-Domäne enthalten Transaktivierungsfunktionen (Danielian et al., 1992), die C-Domäne ist für die DNA-Bindung zuständig, weshalb sie auch als DNA-Bindungsdomäne (DBD) bezeichnet wird (Evans et al., 1988). Die D-Domäne bildet ein Scharnier zwischen der DBD und der E-Domäne, die darüber hinaus noch für die Ligandenbindung und weitere Protein-Protein-Interaktionen notwendig ist (Krust et al., 1986; Laudet et al., 1992). Die E-Domäne wird daher auch als Hormon-Bindungsdomäne (HBD) bezeichnet. Interessanterweise wirken die einzelnen Domänen autonom voneinander. In Domänen austauschexperimenten konnte ein chimärer nukleärer Rezeptor aus den humanen Östrogen- und Glucocorticoid-Rezeptoren hergestellt werden, der die Eigenschaften der einzelnen Domänen neu kombinierte (Green und Chambon, 1987). Mittlerweile sind die Strukturen der DBD (Schwabe et al., 1993; McPhie et al., 1993; Rastinejad et al., 1995) und der HBD (Bourguet et al., 1995; Renaud, 1995; Wagner, 1995) kristallographisch bestimmt. Daraus konnte abgeleitet werden, daß alle nukleären Rezeptoren ähnliche Strukturen innerhalb dieser beiden Domänen einnehmen. Die HBD der nukleären Rezeptoren nimmt eine typische antiparallele

α -helicale „Sandwich“ Struktur ein (Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995). Die Ligan-
denbindungsstelle befindet sich in einer hydrophoben Tasche, in die der Ligand entlang eines
elektrostatischen Feldes gesogen wird. Anschließend wird die beladene Tasche mit der Helix
12 der HBD verschlossen. Diese Art der Ligandenbindung wurde auch als Mäusefallen-Me-
chanismus bezeichnet. Die damit einhergehende apo- zu holo-Konformationsänderung der
HBD bewirkt die optimale Positionierung der Transaktivierungsdomänen. Die HBD ist hoch
konserviert, so daß von den Kristallstrukturen der apo-Konformation von RXR α und der Li-
gandengebundenen holo-Konformation der RAR γ HBD eine kanonische Struktur für alle nuk-
leären Rezeptor E-Domänen abgeleitet werden konnte (Wurtz et al., 1996). In Abb. 28 wurde
diese kanonische Struktur auf die von mir verwendete HBD des Ecdyson-Rezeptor übertra-
gen.



Wie man der Abbildung entnehmen kann, trägt die in der vorliegenden Arbeit verwendete HBD des Ecdyson-Rezeptors (blau) eine Deletion von 25 Aminosäuren im N-terminalen Bereich der E-Domäne.

Durch diese Deletion wurde die Helix 1 komplett und wahrscheinlich auch die Helix 2 (die schwächer konserviert ist) entfernt. Es ist bekannt, daß die entsprechende homologe Helix 1 Region innerhalb des RAR α , des TR sowie anderer nukleären Rezeptoren eine Co-R Box enthält, an der transkriptionelle Co-Repressoren wie N-CoR (Horlein et al., 1995) oder SMRT (Chen und Evans, 1995; Schulman et al., 1997; Vivat et al., 1997) binden. Die Co-Repressoren haben eine hohe Affinität zu dieser Bindungsstelle und werden erst nach der Bindung des Liganden aufgrund der Konformationsänderung aus dieser Position verdrängt. Es ist mehr als wahrscheinlich, daß auch der Ecdyson-Rezeptor eine Co-R Box enthält, wenngleich über die Natur der *Drosophila* Co-Repressoren zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Aussage gemacht werden kann. Höchstwahrscheinlich binden aber in einem heterologen System die entsprechenden Säugetier-Homologe an diese Bindungsstelle. Die Bindung von Molekülen in unmittelbarer Nähe des Übergangs zwischen den beiden Fusionspartnern birgt die Gefahr einer sterischen Inhibition des enzymatischen Zentrums des zu kontrollierenden Proteins. So dürfte die Deletion der Co-R Box von großer Bedeutung für meine Studien mit den Cre-E-Domänen Fusionen gewesen sein.

Von einer Deletion der Helix 12 wurde abgesehen. Die Röntgenstrukturanalysen gaben einen besonderen Aufschluß über die Funktion der Helix 12 für eine Stabilisierung der Ligandenbindung. Nach Bindung des Liganden in der hydrophoben Höhlung der E-Domäne verschließt die Helix 12 die Öffnung zur Bindungstasche, so daß der Ligand im Inneren der E-Domäne gefangen ist. Gleichzeitig wird eine bedeutende Konformationsänderung eingeleitet, die in der Wildtyp Situation zu der Aktivierung des nukleären Rezeptors führt (Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995). Ferner kann man aus der Abb. 28 entnehmen, daß die von mir verwendete E-Domäne keinen Bereich der potentiell inhibierenden D- bzw. F-Domäne umspannt.

Wie in Abb. 8 und Tab. 1 gezeigt wurde (Abschnitt 3.1.3.2.) binden in Kompetitionsassays alle Fusionsproteine aus der Cre Rekombinase und der so modifizierten E-Region die Liganden Muristerone A und Ponasterone A.

Nach ihrer Überführung in den Zellkern können die Liganden-beladenen Steroidrezeptoren an spezifische Regionen der DNA binden. Die DNA-Bindungsregion wird im allgemeinen als Hormon-responsives Element (HRE) bezeichnet und kann aus palindromischen oder direkten Wiederholungen eines kurzen DNA-Motivs bestehen. Die Spacer zwischen den Wiederholungen können variabel und von unterschiedlicher Länge sein. Das Konsensusmotiv für den Ecdyson-Rezeptor besteht aus einer palindromischen Wiederholung des Hexamers AGGTCA. Der Spacer beträgt n=1 Nukleotid. In Natur kommen andere Hexamermotive vor wie AGTG

CA (z.B. Hsp27-EcRE; Eip28/29-EcRE), manche Gene tragen nur eine Kopie dieses Motivs in ihrer stromaufwärts gelegenen Kontrollregion (z.B. Ear1-EcRE; FTZ-F1-EcRE; Umesono et al., 1991). Der EcR-USP Rezeptor-Komplex kann auch an direkte Wiederholungen des Konsensusmotivs binden. In jedem Falle kann das Spacing zwischen den Wiederholungen sehr variabel sein (bis zu 200 bp möglich; Horner et al., 1995; Kato et al., 1995). Die Bindung an das HRE ermöglicht eine Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie. Diese wird wahrscheinlich über sogenannte Brückenmoleküle wie SRC-1/p160 (Onate et al., 1995); TIF1 (Le Douarin et al., 1995); TIF2 (Hong et al., 1996), CBP/p300 (Kamei et al., 1996; Yao et al., 1996; Chakravarti et al., 1996) sowie weiteren Molekülen vermittelt. Ein kurzes Aminosäuremotiv der Sequenz LXXLL (L=Leucine; X=unbestimmt) ist notwendig und hinreichend für diese Interaktion (Heery et al., 1997).

4.4. Der Ecdyson-Rezeptor: Ein Werkzeug der Molekularbiologie in Säugetieren?

4.4.1. Systeme mit posttranslationalen Kontrollelementen

Der zentrale Bestandteil des von mir eingesetzten Steuerungssystems zur Regulation der Cre Rekombinase war der im vorherigen Abschnitt vorgestellte nukleäre Hormonrezeptor für Ecdyson aus *D. melanogaster*. Aufgrund seiner Eigenschaften eignet sich der Ecdyson-Rezeptor theoretisch für Regulationssysteme, die entweder transkriptionelle oder posttranslationale Kontrollelemente umfassen. Frühzeitig nach der Charakterisierung der ersten nukleären Rezeptoren wurde ihr modulärer Aufbau entdeckt. Dabei wurde festgestellt, daß sich die einzelnen Domänen autonom voneinander verhielten und frei miteinander kombiniert werden konnten (siehe oben).

Dieses Prinzip wurde schon bald für posttranslationale Kontrollsysteme angewendet, indem man einzelne Domänen mit völlig anderen Molekülen kombinierte, um so neuartige chimäre Fusionsproteine zu erhalten (Picard et al., 1988; Eilers et al., 1989; Picard, 1994). So konnte man z.B. durch Fusion des Myc Oncogens mit der HBD des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) eine Hormon-abhängige Transformation von Zielzellen erreichen (Eilers et al., 1989). Neuartige DNA-bindende Moleküle wurden durch die Fusion der GAL-4 DNA-bindenden Domäne mit den C-Termini von nukleären Rezeptoren wie dem Östrogen-Rezeptor konstruiert (Webster et al., 1988; Braselmann et al., 1993). Das Problem der unerwünschten Kreuzreaktion mit endogenem Liganden konnte durch die Verwendung von mutierten Hormonbindungsdomänen, die sich nur durch einen synthetischen Liganden aktivieren ließen, vermieden werden. Im Falle des Östrogen-Rezeptors (ER) wurde die Mutante G521R verwendet, die keine Affinität zu endogenen Östrogenen wohl aber zu dem synthetischen Antagonisten 4-OH-Tamoxifen besaß (Littlewood et al., 1995; Feil et al., 1996; Zhang et al., 1996; Schwenk et al., 1998). Im Falle des humanen Progesteron-Rezeptors wurde die Mutante hPRB891 verwendet, die lediglich aus der E-Domäne ohne die AF-2 Region bestand (α 640-891;

Wang et al., 1994). Diese Mutante ließ sich durch endogenes Progesteron nicht mehr aktivieren, wohl aber durch synthetische Progesteron Antagonisten wie RU486. Die am häufigsten verwendeten Antagonisten wiesen jedoch verschiedene Nebenwirkungen auf, oftmals wirkten die synthetischen Liganden abortiv, so daß sie für Embryogenese-Studien nicht in Frage kamen (Wang et al., 1994; Stewart, persönliche Kommunikation).

Dieser Umstand lenkte schon bald das Interesse auf den Ecdyson-Rezeptor, da für ihn keine endogenen Vertebraten Agonisten bzw. Antagonisten bekannt waren. In einer frühen Studie konnte die Aktivität des Ecdyson-Rezeptors in Säugetierzellen nachgewiesen werden (Christopherson et al., 1992). Chimäre Proteine, die aus der *Herpes Simplex Virus* Aktivator-Domäne VP16, der Lex A DNA-Bindungsdomäne aus *E. coli* und der D/E/F-Domäne des Ecdyson-Rezeptors bestanden, konnten in Abhängigkeit von exogenen Hormongaben entsprechende Reporterkonstrukte in humanen 293 Zellen aktivieren. Eine Co-Transfektion des Co-Rezeptors schien nicht notwendig gewesen zu sein. Allerdings war der *Drosophila* Ligand 20-Hydroxy-Ecdyson in Säugetierzellen nicht wirksam. Zur Aktivierung mußten wie in meiner Studie entweder Muristerone A oder Ponasterone A verwendet werden. Dabei konnten keine Kreuz-Reaktionen mit anderen Liganden festgestellt werden. (Christopherson et al., 1992). Dieses Ergebnis befand sich in Widerspruch zu anderen Untersuchungen, in denen die funktionelle Regulierung eines Proteins durch die Fusion mit dem Ecdyson-Rezeptor scheiterte (Picard, 1994; Hogness; Stewart, Metzler, persönliche Kommunikation; Busslinger, zitiert in Picard, 1994). Im allgemeinen wurden diese Schwierigkeiten auf den nur sehr schwer zu kontrollierenden oder nicht vorhandenen Co-Rezeptor Usp geschoben. In manchen Zellen schienen endogene RXR's den Co-Rezeptor Usp zu ersetzen, in anderen hingegen resultierte das Fehlen endogener oder exogener Co-Rezeptoren in einem Fehlen der Ecdyson-Rezeptor Aktivität. Ein weiteres Argument gegen die Verwendung des Ecdyson-Rezeptors lag in seiner Struktur. So schien die D-Domäne, die als flexibles Scharnier zwischen der DBD und der HBD fungiert, inhibierend auf die Gesamtaktivität in Fusionsproteinen zu sein. Auch waren artifizielle und aberrante Interaktionen mit der basalen Transkriptionsmaschinerie nicht auszuschließen.

In Versuchen, in denen die gesamte EcR cDNA mit der GAL4 DNA-Bindungsdomäne fusionierte (GAL4-EcR) wurde, konnte ebenfalls weder eine Transaktivierung noch eine Aktivitätsregulierung nach Zugabe von exogenen Hormon erzielt werden (Abb. 4). Daher wurde nicht der gesamte Ecdyson-Rezeptor verwendet, sondern ausschließlich die E-Region. Sie erfüllt immer noch eine Vielzahl von Aufgaben, die von den Interaktionen mit dem Co-Rezeptor und der basalen Transkriptionsmaschinerie bis zur eigentlichen Ligandenbindung reichen. Die E-Domäne wurde durch eine kleine Deletion von 25 Aminosäuren am N-terminalen Ende modifiziert (Abb.28). So ist bekannt, daß die Transaktivierungsdomäne innerhalb einer HBD einen negativen Einfluß auf die Gesamtaktivität des Fusionsproteins haben kann. Dieses wurde für Fos-Östrogen-Rezeptor Fusionen und Dihydrofolat Reduktase-GR Fusionen gezeigt

(Schuermann et al., 1993; Israel und Kaufman; 1993). Die so modifizierte E-Region wurde für die Fusionen mit der GAL4-Domäne (Abb. 3) sowie der Cre Rekombinase verwendet (Abb.7).

Im ersten Teil des Ergebnisteils (Abb. 3-6) wurde getestet, ob die Aktivität einer Fusion aus dem EcR mit einem heterologen, konstitutiv aktiven Transaktivator von Ligandgaben abhängig gemacht werden konnten. Dabei wurde als Transaktivator die Fusion GAL4-VP16 gewählt, die sich als sehr starker Transaktivator in Säugetierzellen erwiesen hat. Es wurde gezeigt, daß die Insertion einer E-Domäne zwischen der GAL4 und der VP16 Domäne tatsächlich den gewünschten Effekt zeigte. Die E-Domänen Fusion war 300 mal weniger aktiv als der unmodifizierte Transaktivator GAL4-VP16. Ferner konnte seine Transaktivierung von Ligandgaben abhängig gemacht werden. Es konnten Induktionsraten bis zum neunfachen des Ausgangslevels erzielt werden. Die Fusion aus der E-Region und der GAL4-Domäne (GAL4-E) ohne die VP16 Domäne besaß dagegen keine Fähigkeit zur Transaktivierung. Das bedeutet, daß die Transaktivierungsdomäne AF-2 innerhalb der E-Domäne unter den getesteten Bedingungen entweder zu schwach oder aufgrund der N-terminalen Deletion ihre Funktion eingebüßt hatte.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Zugabe des nativen Heterodimerisierungspartners USP eher inhibierend auf die Gesamtinduktion nach Zugabe des Liganden wirkte. Ob dieser negative Einfluß auf eine direkte Interaktion mit der E-Region zurückzuführen war, oder ob hier indirekte Einflüsse des RXR-Homologs wirksam waren, konnte in dem Testsystem nicht ermittelt werden. Auch wurde nicht deutlich, ob ein Heterodimerisierungspartner für die Aktivität der E-Region notwendig war. Unter den gewählten Versuchsbedingungen bestand die Möglichkeit, daß Heterodimerisierungspartner wirksam werden konnten. Die Tatsache, daß es zu Aktivitätsveränderungen bei der Verwendung Serum-armen Mediums kam (Abb. 6), könnte darauf hinweisen, daß die Konzentration derartiger Dimerisierungspartner durch Wachstumsfaktoren beeinflusst wurde. Einen endgültigen Beweis konnte hier jedoch nicht erbracht werden.

Als Fazit läßt sich festhalten, daß die E-Region autonom funktionierte und die Aktivität von Fusionsproteinen von Ligandengaben abhängig machen konnte.

Auf der Basis der mit den initialen Fusionskonstrukten erzielten Resultate wurden entsprechende Fusionen mit der sequenzspezifischen Cre Rekombinase hergestellt und getestet. Da die optimale Position der E-Domäne nicht vorhersagbar war, wurden verschiedene Fusionsproteine aus der Cre Rekombinase und der E-Domäne hergestellt. Wie in Abb. 8 und Tab. 1 gezeigt wurde (Abschnitt 3.1.3.2.), banden in Kompetitionsassays alle Fusionsproteine aus der Cre Rekombinase und der E-Region die Liganden Muristerone A und Ponasterone A, allerdings in unterschiedlichem Ausmaße. So schien eine N-terminale E-Region sehr viel bes-

ser von seinem Liganden besetzt zu werden als eine C-terminale E-Region. Die N-terminalen Fusionen EC und SOE-L (siehe unten) hatten eine ca. 5 Mal so hohe Affinität zu dem Liganden Muristerone A als die C-terminalen Fusionen CE, ECE sowie CE₂ (Abb. 8, Tab. 1). Das könnte darauf hindeuten, daß der Ligand einen bevorzugten Annäherungsmechanismus an die E-Domäne besitzt. N-terminal gelegene Sequenzen können u.U. sterisch inhibierend auf die Ligandenbindung wirken. Interessanterweise deckt sich dieser Befund mit den Induktionen der Cre-Aktivität der entsprechenden Fusionen. Während EC schon bei einer Konzentration von 1 µM Muristerone seine optimale Rekombinationsaktivität erzielte, erzielten die Fusionen CE und CE₂ diese erst bei der höheren Muristerone-Konzentration (Abb. 11).

Die Interaktion des Fusionsproteins mit dem Liganden war im Vergleich zum Ecdyson Wildtyp Rezeptor verändert, da die Heterodimerisierungspartner USP oder RXR für die Ligandenbindung nicht notwendig zu sein schienen. In der Tat war die Affinität der Fusion EC zu Muristerone sogar noch höher als die der RXR co-exprimierenden Konstrukte VgRXR bzw. SOE-L (Tab. 1; 2). Ferner wirkte eine Co-Transfektion von Usp bzw. RXR eher inhibierend auf die Transaktivierungsfähigkeit der Fusionen (Abb. 2; 11). Dieser Befund steht im Widerspruch zu bisher erzielten Ergebnissen auf diesem Gebiet. Eine mögliche Erklärung könnte wiederum in der Sequenz der von mir verwendeten E-Region liegen: Wahrscheinlich hatte die N-terminale Deletion eines kleinen Teils der E-Domäne die Gesamtkonformation dahingehend verändert, daß die Ligandenbindung unabhängig von der Heterodimerisierung erfolgen konnte. Die Inhibition der USP/RXR Co-Transfektion war wahrscheinlich auf sterische Effekte zurückzuführen: Die komplexierten USP/RXR-Muristerone-E-Regionen dürften zu stark mit der Anlagerung der Cre Rekombinase an ihre Zielsequenz interferiert haben. Bei der Interpretation der Versuche ist weiterhin zu bedenken, daß die Versuche im allgemeinen in Normalmedium durchgeführt wurden. Diese Versuchsbedingung wurde gewählt, weil sie eher als Serum-arme Bedingungen an die Situation *in vivo* heranreicht. Unter diesen Kulturbedingungen dürfte jedoch ein gewisser nukleärer Rezeptor-Pool in den Zellen vorhanden gewesen sein, der zumindestens mit einem Teil der Fusionen komplexierte. Für diese Hypothese spricht ebenfalls das Ergebnis von Titrationsexperimenten mit CE₂ (Abb. 12). Geringe RXR Konzentrationen (um 1,25 pg/Zelle) wirkten hier in der Tat positiv auf die Gesamtaktivität der Cre-Fusion. Bei der unter den Standardbedingungen verwendeten RXR Konzentration von 5 pg/Zelle (0,25 µg/µl) war der Einfluß von RXR inhibierend.

Die Resultate bewiesen, daß der Ecdyson-Rezeptor wie andere nukleäre Rezeptoren zur post-translationalen Kontrolle von Enzymaktivitäten einsetzbar war (a: Kontrolle von GAL4-VP16; b: Kontrolle der Cre Rekombinase). Voraussetzung des Einsatzes des Ecdyson-Rezeptors für regulative Zwecke war jedoch die Einführung entsprechender Modifikationen, welche die Konformation des Rezeptors veränderte.

4.4.2. Systeme mit transkriptionellen Kontrollelementen

Der Frage, ob sich der Ecdyson-Rezeptor für die transkriptionelle Steuerung von Zielgenen eignete, wurde von der Arbeitsgruppe um R. M. Evans (No et al., 1996) bearbeitet. In Vorversuchen mit Säugetier-Zellen wurde nachgewiesen, daß sich die Aktivität des Ecdyson-Rezeptors und seines Partners USP nach Zugabe von Muristerone A ca. 3 fach steigern ließ (Yao et al., 1992; Yao et al., 1993).

Darauf aufbauend wurden verschiedene Modifikationen an dem Ecdyson-Rezeptor System durchgeführt, die zu einer besseren Steuerbarkeit des Systems führten. Die Verbesserungen betrafen zunächst den Transaktivator: So wurde die Aktivität des Ecdyson-Rezeptors durch eine Fusion mit der Aktivierungsdomäne VP16 aus dem Herplex Simplex Virus erheblich gesteigert. Durch die Modifikation dreier Aminosäuren in der DBD-Domäne wurde die DNA-Bindungsspezifität verändert. Das resultierende Konstrukt wurde VgEcR genannt. Zweitens wurde der entsprechende Reporter pINDlacZ konstruiert, der neben den Ecdyson-responsiven-Elementen (EcREs) Sp1 Bindungsstellen besaß, die sein Aktivierungsmaximum um den Faktor 5 ansteigen ließ. Da bekannt war, daß das Vertebraten-Homolog von EcR, der Farnesoid-X-Rezeptor FXR, ebenfalls an EcREs binden konnte, wurden die palindromischen HBD-Elemente in Hybride aus dem Glucocorticoid-responsiven-Element (GRE) und dem EcRE umgewandelt, so daß keine Interaktion mit FXR mehr möglich war. Wurde VgEcR mit RXR und dem LacZ-Reportergen stabil in 293 Zellen exprimiert, konnte eine 1200 fache Induktion in der Transaktivierung erzielt werden. In transienten Assays wurden ca. 900 fache Induktionen erzielt (No et al., 1996). Die Hintergrundaktivität des Reporters war dabei jeweils unbedeutend.

In der von mir verwendeten Version wurden die Transaktivatoren VgEcR und RXR zunächst von dem bicistronischen Vektor VgRXR exprimiert. Anstelle von LacZ wurde die Cre Rekombinase von dem Ecdyson-responsiven Promotor des Vektors pIND exprimiert. Die Induktion der Rekombinase wurde indirekt durch die Co-Transfektion eines weiteren Reporters sowie eines internen Standards gemessen. Der Reporter Pac1 (PGKpaX1) bestand aus einer *lacZ* Genkassette, die stromaufwärts von zwei loxP Sequenzen flankiert war, die eine *pac* Genkassette mit anschließendem Stop-Codon flankierten (Kellendonk et al., 1996). Das Stop-Codon, das eine Translation des Reporters verhinderte, konnte durch eine Cre vermittelte Rekombination entfernt werden (Abb. 9). Nach Abschluß der Transfektion wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Die Quotient aus *lacZ* positiven Zellen geteilt durch die Alkalische Phosphatase positiven Zellen (interner Standard) gab Aufschluß über die relative Aktivität der Cre Rekombinase (B/R-Quotient). Das Ergebnis meiner transienten Transfektionen in 10T1/2 Zellen war überraschend, zeigte es doch, daß sich die Cre Rekombinase im Evan'schen System im Gegensatz zum LacZ Gen nicht regulieren ließ (Abb. 14; 17; 18). Statt dessen war die basale Aktivität des Cre Expressionsplasmids pINDCre ausreichend für eine konstitutive Aktivierung des Pac1 Reporterkonstruktes. Erst bei einer Konzentration von 0,2 pg pINDCre pro

Zelle (Es wurden ca. 50000 Zellen pro Transfektionsansatz transfiziert $\Rightarrow 0,01 \text{ mg/} \mu\text{f} \approx 0,2 \text{ pg/Zelle.}$) wurde so wenig Cre Rekombinase exprimiert, daß das Substrat nicht mehr umgesetzt wurde. Wurde die Konzentration auf ein 10 faches auf 2 pg/Zelle erhöht, konnte man bereits eine signifikante Hintergrundaktivität ohne Hormonzugabe feststellen. Diese war direkt proportional zu der Konzentration des Expresssionsvektors (Abb. 14; 17; 18). Hinzu kam, daß diese Aktivität unabhängig von einer Co-Transfektion des Transaktivators VgRXR war. Wenn man statt des Transaktivators einen leeren Kontrollvektor transfizierte (pKS), erzielte man sogar noch höhere Aktivitäten der Cre Rekombinase. Das bedeutete, daß die Promotor-Region des Expressionsplasmids pIND von anderen endogenen Transkriptionsfaktoren in 10T1/2 Zellen auf einen basalen Level aktiviert werden konnte. Die stromaufwärtsgelegene Region des Vektors enthielt 5 modifizierte E/GRE HREs (Hormon responsive Elemente), die sich oberhalb eines minimalen Hitzeschock-Promotors (HSP) befanden. Eine Auflistung von natürlichen und artifiziellen HRE's gibt Tab. 10. Aus ihr kann man entnehmen, daß die E/GRE HREs chimär aus den nativen Hsp27 EcRE und GRE zusammengesetzt war. Die Spacer zwischen den Elementen waren nicht regelmäßig, um mögliche Interaktionen zwischen einzelnen Elementen zu vermeiden. Wie man aus Tab. 10 entnehmen kann, besteht eine gewisse Flexibilität in der Wahl der EcREs durch den Ecdyson-Rezeptor. So konnte der Ab-

Tabelle 10:

Ecdyson-Rezeptor responsive Elemente im Vergleich

Hormon responsives Element	Sequenz	Referenz
Hsp 27 EcRE	ATTGGACA <u>AGTGCA</u> T TGAACC	Umesono et al., 1991
Ear1	CTTGTCTCT	
FTZ-F1	GGTTAGAATGT <u>AGGTCA</u> GAGAGCTAACC	
TREpal	GGTTGTCTCA <u>AGGTC</u> ACCGAGTCAACC	
DR5-200	GGTTAGCTTC <u>AGGTC</u> ATGACCT GAGAGCTAACC	
	Half sites Pu(A)GGTCA – Spacer 5-200 bp	Kato et al., 1995
GR (Glucocorticoid-RE)	AGAACAnnn <u>TGTTCT</u>	No et al., 1996
pIND (E/GREx5-ΔHSP)	<u>AGTGCA</u> T <u>TGTTCT</u> – Spacer 22-30 bp	

stand zwischen den einzelnen Elementen einer direkten Wiederholung flexibel sein und bis zu 200 bp betragen (DR5-200; Kato et al., 1995). Es war demnach sehr wahrscheinlich, daß ein endogener nukleärer Rezeptor oder ein vorzeitig aktivierter EcR an die direkten Wiederholungen band und so die hohe Hintergrundaktivität hervorrief. Da die Hintergrundaktivität nicht nur in einer eta-blierten Zelllinie (10T1/2), sondern auch in ES-Zellen vorgefunden wur-

de, sind an dem Expressionsvektor Verbesserungen auszuführen, damit er in den Säugerzellen wirklich einsetzbar wird.

Die hier erzielten Ergebnisse gelten nur für die Cre Rekombinase. Das Evan'sche System arbeitet völlig einwandfrei, wenn man LacZ von dem Expressionsplasmid pIND exprimieren ließ (Tab. 3). In mindestens einer weiteren Publikation wurde die Wirksamkeit des Evan'schen Systems ebenfalls bewiesen (Tamura et al., 1998). Das bedeutet, daß das Transaktivatorssystem von Fall zu Fall zu testen ist. Die Cre Rekombinase scheint ein sehr aktives Enzym zu sein. Wenige Moleküle pro Zelle sind offensichtlich ausreichend, um die Rekombination des Reporters pPac1 durchzuführen.

An dem transkriptionellen System waren Veränderungen vorzunehmen, um es für die Regulierung der Cre Rekombinase brauchbar zu machen. Von hoher Priorität war es, die Hintergrundaktivität des Transaktivatorsystems auf ein Minimum zu verringern. Deshalb wurden Fusionen aus den Elementen des bicistronischen Transaktivator-Vektors, VgEcR und RXR, hergestellt. Dieses geschah in der Vorstellung, dadurch die Menge an freigesetztem RXR, das für Kreuzreaktionen mit anderen Steroidrezeptoren verantwortlich sein konnte, zu vermindern. Zwei verschiedene Fusionen, SOE-H und SOE-L wurden getestet. Die erste bestand aus einer einfachen Fusion aus VgEcR und RXR. Die beiden Moleküle waren mit einem *HpaI* Linker miteinander verbunden. In der zweiten hingegen waren die beiden Proteine durch einen optimierten Linker nach Argos (Argos et al., 1991) miteinander verbunden (Abb. 15).

In transienten Transfektionen waren die Fusionen bei geringer Konzentration von ca. 0,2 pg pro Zelle ebenfalls inaktiv (Abb. 17A). Bei einer mittleren Konzentrationen von pINDCre (2 pg/Zelle) konnte man mit der optimierten Fusion SOE-L nahezu eine Verdopplung in der Cre-Aktivität beobachten (Abb. 17B). Diese Induktion war nur bei niedrigen Muristerone A Konzentrationen sichtbar. Der optimierte Linker von SOE-L mit der Sequenz Glycin-Serin-Glycin-Serin-Glycin war dabei von zentraler Bedeutung für die Regulation der Cre Rekombinase. Die Fusion SOE-H war nämlich ebensowenig wirksam wie das bicistronische Ausgangskonstrukt VgRXR.

Während SOE-L die Cre Rekombinase innerhalb gewisser Grenzen aktivieren konnte, waren VgRXR und SOE-H dazu nicht in der Lage. Um die Gründe für die unterschiedlichen induktiven Eigenschaften der Transaktivatoren zu überprüfen, wurde eine semiquantitative RT-PCR von RNA-Extrakten transfizierter Zellen durchgeführt (Abb. 17C). Dabei wurde festgestellt, daß alle drei Transaktivatoren ein Anstieg in der Cre mRNA Konzentration nach Zugabe von 1 µM Muristerone A bewirkten. Am höchsten fiel dieser Anstieg für SOE-H aus. Das bedeutete, daß der Grund für die fehlende Induktion von VgRXR und SOE-H auf der post-translationalen Ebene zu suchen war. Interessant waren in diesem Zusammenhang die Basal-

aktivitäten der Transaktivatoren. Hier war die Cre-mRNA Konzentration am höchsten für VgRXR, gefolgt von SOE-H. Im Falle von SOE-L war die Cre-mRNA Ausgangskonzentration um ca. 60 % verringert. Es ist damit denkbar, daß im Falle von VgRXR und SOE-H ein mRNA Konzentrations-Schwellenwert überschritten wurde, der in einer für den Substratsatz ausreichende Expression der Cre Rekombinase resultierte. Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, daß die Cre Rekombinase ein sehr stabiles und aktives Molekül ist. Wahrscheinlich reicht schon eine geringe Anzahl von Cre Molekülen aus, um eine erfolgreiche Rekombination zwischen loxP Sequenzen einzuleiten (D. Metzler, M. Buckingham, persönliche Kommunikation).

Ferner belegten die RT-PCR Experimente, daß die Abnahme der Cre-Aktivität bei höheren Muristerone A Konzentrationen transkriptionell bedingt ist. Alle Konstrukte haben in Gegenwart von 10 µM Muristerone A eine geringere Transaktivierungsfähigkeit (Abb. 17C).

4.4.3. Ein System, das transkriptionelle und posttranslationale Kontrollelemente verbindet, eignet sich zu Regulation der Cre Rekombinase

Eine Kombination der in den vorangegangenen Kapiteln besprochenen transkriptionellen und posttranslationalen Kontrollelemente ermöglichte schließlich eine verlässliche Kontrolle der Cre Rekombinase (Abb. 18; 19). Hierbei wurden die Cre-Fusionen mit dem Evan'schen und modifizierten System kombiniert und in transienten Transfektionen getestet.

Die Kombination der Kontrollelemente resultierte in einer erheblichen Reduzierung der Basalaktivität der Cre Rekombinase (Abb. 18B; 19B). Für CE₂ konnte die Basalaktivität des Expressionsvektors in Abwesenheit eines Transaktivators sogar auf Null reduziert werden. Die Verwendung von Cre-Fusionen verminderte die Basalaktivität der Cre Rekombinase auf ein zu vernachlässigendes Maß. Der Grund für die hohen Aktivitäten der unregulierten Cre Rekombinase (Abb. 14; 17; 18) war wahrscheinlich auf einen Amplifizierungseffekt aufgrund der Beschaffenheit des Testsystems zurückzuführen. Wenige Cre Moleküle waren ausreichend, um eine für die durch die β -Galaktosidase vermittelte Blaufärbung hinreichende Menge an Reporterkonstrukten zu rekombinieren. Die Reduzierung der Cre-Basalaktivität in Abwesenheit von Muristerone A war auch der Grund für die nun sichtbaren Induktionen durch die Transaktivatoren VgRXR und SOE-L. Die Aktivierungslevel waren nämlich im Allgemeinen niedriger als bei der unregulierten Cre Rekombinase. Als Erklärungsmöglichkeit könnte eine verringerte Enzymaktivität der Cre Rekombinase-Fusionen dienen, die aufgrund von ungünstigen sterischen Bedingungen hervorgerufen werden könnte.

In der Fibroblastenzelllinie wurden in der Kombination, die aus dem ursprünglichen Evan'schen System und der Fusion CE₂ bestand, mit einer vierfachen Induktion die höchste gemessene Induktionsrate erzielt (Abb. 18A; 19A). Da die Cre Rekombinase ein sehr aktives Enzym darstellt, war diese relativ geringe Induktionsrate bereits ausreichend für eine Cre/loxP ver-

mittelte Rekombination. Entscheidend war in diesem Falle nicht die Höhe der Induktionsrate, sondern die Tatsache, daß der Hintergrund sehr gering gehalten werden konnte.

Die Transaktivator-Fusion SOE-L zeigte in Kombination mit den Cre-Fusionen nicht ganz so gute Induktionswerte wie das Evan'sche bicistronische System VgRXR. Dieses war auf etwas erhöhte Cre-Aktivitätswerte in Abwesenheit von Muristerone A zurückzuführen. Lediglich für die unregulierte Cre Rekombinase lieferte SOE-L eindeutig bessere Werte (Abb. 18D; 19D). Dieser Umstand war nur damit erklärbar, daß die forcierte Heterodimerisierung des Ecdyson-Rezeptors mit seinem Co-Rezeptor RXR (SOE-L) zu einem leichten Anstieg in der Basalaktivität des Cre-Expressionsvektors führte. Dieses machte sich scheinbar nur für die Cre-Fusionen negativ bemerkbar.

Im allgemeinen war die Aktivität der unregulierten nativen Cre Rekombinase im uninduzierten Zustand 2-4 Mal höher als die der Cre-Fusionen. Wie die Daten der RT-PCR bewiesen, dürfte sich die tatsächliche Anzahl der transkribierten Cre-/Cre-Fusionsmoleküle nur sehr unwesentlich unterscheiden haben. Erst auf der posttranslationalen Ebene unterschieden sich die einzelnen Aktivitäten der Cre-Konstrukte. Durch die Differenz von uninduzierter und induzierter Cre-/Cre-Fusions-Aktivität, die sich durch die oben beschriebenen Amplifizierungsschritte verstärkten, wurden die Unterschiede in den Gesamtaktivitäten der einzelnen Kombinationen sichtbar. Wahrscheinlich führte dieser Amplifizierungseffekt zu dem suboptimalen Effekt von CE in Verbindung mit SOE-L. Die Aktivität von CE in Verbindung mit SOE-L war erstaunlicherweise höher als die der unregulierten Cre-Rekombinase (Abb. 18D). In Wirklichkeit dürfte aber nur ein geringer Anstieg in der Zahl der aktiven Cre Moleküle verantwortlich für diesen Effekt gewesen sein.

Das kombinierte Expressionssystem für die Cre Rekombinase wurde anschließend auch in Transfektionen in ES-Zellen getestet (Tab. 4). Zunächst wurden dort für die unregulierte Cre Rekombinase im wesentlichen die Ergebnisse, die mit den etablierten Zelllinien erzielt wurden, rekapituliert. Die unregulierte Cre-Rekombinase zeigte eine sehr hohe Hintergrundaktivität in ES-Zellen, die unabhängig vom co-transfizierten Transaktivatorkonstrukt war. Deshalb wurde auch hier eine Kombination von transkriptionellen und posttranslationalen Kontrollelementen für die Cre Rekombinase verwendet. In der Kombination des Evan'schen Transaktivators VgRXR und der Cre-Fusion EC konnte nun eine verlässliche Steuerung der Cre Rekombinase nachgewiesen werden. Erst nach Muristerone A Zugabe konnte eine Cre/loxP vermittelte Rekombination in 22 % der analysierten ES-Zellkolonien nachgewiesen werden. Die erzielte Frequenz lag nicht in dem optimalen Bereich, allerdings gab es keine Cre Hintergrundaktivität. In Zukunft läßt sich die Frequenz der Cre/loxP vermittelten Rekombination vielleicht noch durch eine Co-Selektion nach der Elektroporation von Cre steigern. Alle anderen Cre Fusionen waren inaktiv und ließen sich nicht aktivieren. Vielleicht resultiert dieses Ergebnis aus der hohen Affinität von EC zu Muristerone A (Tab.1). In diesem Falle müßte

man die Anwesenheit eines spezifischen nukleären Rezeptors in den ES-Zellen postulieren, der das in das Medium gegebene Muristerone A herausfiltert. Das durch den Metabolismus der ES-Zellen sehr leicht angesäuerte Medium könnte sich außerdem noch nachteilig auf die Stabilität des Steroidhormons Muristerone A auswirken.

Als Fazit läßt sich festhalten, daß eine Kombination von transkriptionellen und posttranslationalen Steuerungselementen eine wirkungsvolle Kontrolle der Cre Rekombinase in etablierten und primären Zelllinien ermöglicht. Im Gegensatz zu anderen Regulationssystemen, deren Hauptaugenmerkmal in einer möglichst hohen Induktionsrate besteht, wurde hier vor allem auf die Reduzierung der Hintergrundaktivität geachtet. Es stellte sich dabei heraus, daß dieser Faktor von enormer Bedeutung für die Regulation der sehr aktiven Cre Rekombinase war. Damit wurde ein ubiquitär einsetzbares Regulationssystem zur Steuerung der Cre Rekombinase, die ein wichtiges molekularbiologisches Werkzeug darstellt, etabliert. Es eignete sich zur Cre/loxP vermittelten Rekombination sowohl von episomaler als von endogener, genomischer DNA. Der Zeitpunkt der Rekombination ließ sich durch die Zugabe eines Induktors frei wählen.

4.5. Die Verwendung des Cre/loxP Systems zur Analyse des myogenen Faktors Myf5

4.5.1. Myogenese und Muskelregeneration *in vivo*

Wie in der Einleitung (Kapitel 1) dargelegt, spielt der myogene Transkriptionsfaktor Myf5 eine große Rolle bei der myogenen Determinierung von Muskelvorläuferzellen *in vitro* und *in vivo* (Braun et al., 1989; Braun et al., 1992). Für Prozesse während der Embryogenese wurden seine Aufgaben in „Knock-out“ Studien in der Maus funktionell analysiert (Braun et al., 1992; Tajbakhsh et al., 1996). Dabei zeigte sich, daß zwischen Myf5 und dem myogenen Transkriptionsfaktor MyoD eine gewisse Redundanz besteht. In den Myf5^{-/-} Mäusen setzte die Muskelbildung mit zweitägiger Verspätung mit dem Beginn der Expression von MyoD ein (Braun et al., 1994). In den entsprechenden MyoD^{-/-} Mutanten wurde Myf5 hochreguliert (Rudnicki et al., 1992). Erst in der Myf5/MyoD^{-/-} Doppelmutante unterblieb die Muskelbildung vollständig (Rudnicki et al., 1992). Analysen in der jüngeren Zeit ergaben, daß das „paired box“ Gen Pax3 parallel zu Myf5 agiert und die Expression von MyoD in Abwesenheit von Myf5 initiieren kann (Tajbakhsh et al., 1997).

Die Analyse der Muskelentwicklung in der juvenilen oder adulten Maus gestaltet sich weitaus schwieriger. Denn die homozygoten Myf5^{-/-} Mutanten sind letal und sterben unmittelbar nach der Geburt. Myf5 hat zusätzlich zur zellautonomen Funktion für die Muskelentwicklung eine nicht-autonome Funktion für die distale Rippenentwicklung (Braun et al., 1992). Myf5^{-/-} Mäuse besaßen keinen funktionellen Brustkorb und konnten daher nach der Geburt nicht atmen.

Mit Hilfe von Expressionsanalysen konnte nachgewiesen werden, daß in der Region der embryonalen Myogenese, dem Dermamyotom, die Expression mehrerer Signalmoleküle der Fibroblasten Wachstumsfamilie, wie FGF-4 und FGF-6 unterblieb (Grass et al., 1996). Der Rippendefekt zeigte darüber hinaus große Ähnlichkeiten zu dem, der in der homozygoten PDGF α -Rezeptor^{-/-} Mutante entdeckt wurde. Dieser Rezeptor ist im Sklerotom und in einer geringeren Konzentration im Dermamyotom exprimiert und könnte als Rezeptor für PDGF α dienen, dessen Expression in den Myf5^{-/-} Mutanten ebenfalls herunterreguliert war. In der Tat beobachtet man in der Myf5^{PDGF α} „Knock-In“ Maus eine partielle Abmilderung des Rippenphänotyps (P.Soriano, persönliche Mitteilung). Versuche mit Hühnchen-Wachtel Chimären zeigten, daß der distale Rippenteil von Zellen des Dermamyotoms gebildet wird, während der proximale Anteil vom Sklerotom gebildet wird (Kato und Aoyama, 1998). Das bedeutet, daß die von Myf5 eingeleitete Signalkaskade eher lokal wirkt und keine Kompartiment-Grenze überschreiten muß.

Mit den vorhandenen Maus-Modellen lassen sich Fragen des Muskelwachstums und der –regeneration nicht beantworten. In Säugetieren werden diese Prozesse von sogenannten Satelliten-Zellen aus gesteuert, einkernigen, undifferenzierten Zellen, die ein hohes Proliferationspotential besitzen. Sie werden während der Embryogenese um den Tag 17 herum als eigenständige myogene Linie gebildet (Bischoff und Heintz, 1994). Diese Stammzellen sind zur Selbsterneuerung fähig (Bischoff, 1996). Durch ein Aktivierungssignal, das möglicherweise von der Expression der myogenen Faktoren Myf5 und MyoD ausgeht (Megeney et al., 1996; Yablonka-Reuvini und Rivera; 1994), werden hochproliferative myogene Vorläuferzellen (mcp) gebildet, die sich schließlich in differenzierte Muskelfasern umwandeln. Die Expression von Wachstumsfaktoren, wie FGF-6, spielt dabei ebenfalls eine große Rolle (Floß et al., 1997).

In mdx-Mäusen, die eine Punktmutation im Dystrophie-Gen tragen und damit als Modellsystem für humane Dystrophie-Mutationen dienen, sind bestimmte Aspekte der Muskelentwicklung gestört (Sicinski et al., 1989; Ahn und Kunkel, 1993). Das Muskelgewebe von Mdx-Mäusen ist im Gegensatz zu menschlichen Dystrophie Patienten weitestgehend unauffällig, da die Mäuse eine höhere Muskelregenerations-Fähigkeit als Menschen besitzen. Lediglich im Zwerchfell der Maus konnten dystrophische Veränderungen festgestellt werden (Stedman et al., 1991). Durch Züchtungen von mdx/MyoD^{-/-} sowie mdx/FGF-6^{-/-} doppelt homozygoten Mäusen (Megeney et al., 1996; Floß et al., 1997) konnten die dystrophischen Veränderungen in der mdx Maus verstärkt werden und Aspekte der Muskelregeneration näher analysiert werden. So zeigten mdx/MyoD^{-/-} Mäuse eine verstärkte Myopathie aufgrund einer verminderten Muskel-Regenerationsfähigkeit. Dagegen war die Anzahl der undifferenzierten Satelliten-Zellen erhöht. Das bedeutete, daß mit dem Fehlen von MyoD ein wichtiges Signal zur Differenzierung der Satellitenzellen ausblieb. Die unreifen Zellen konnten vermehrt proliferieren und

so die Satelliten-Zellzahl signifikant erhöhen. In den mdx/FGF-6^{-/-} Mutanten war die Anzahl der MyoD und Myogenin positiven Zellen ebenfalls aufgrund des Fehlens von proliferativen Signalen seitens FGF-6 erheblich reduziert. So wurde eine allgemeine Abschwächung der Hypertrophie in mdx/FGF-6^{-/-} Mäusen festgestellt (Floß et al., 1997).

4.5.2. Die funktionelle Analyse von Myf5

Über die Rolle von Myf5 während der Prozesse der Muskelregeneration *in vivo* können zum derzeitigen Zeitpunkt keine Aussagen gemacht werden. So sind auch Analysen von Mäusen, denen mehrere myogene Faktoren fehlen, bisher auf das Embryonalstadium beschränkt. Daher besteht ein großer Bedarf nach einem konditionellen „Knock-Out“ Allel von Myf5.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein wesentlicher Beitrag zur konditionellen Inaktivierung von Myf5 geschaffen (siehe Abschnitt 4.1.). Die dabei angewandte Strategie beruhte auf dem binären Cre/loxP Rekombinations-System (Sauer und Henderson, 1989; Gu et al., 1993). Dabei wird das zu analysierende Gen von loxP Sequenzen flankiert und anschließend mit transgen exprimierenden Cre-Mäusestämmen verpaart. Die Nachkommen dieser Mäuse können eine Gewebe- und/oder zeitlich-regulierte Deletion des zu analysierenden Gens besitzen (siehe Abschnitt 4.1.).

Um eine Interferenz mit der basalen Transkriptionsmaschinerie zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit die Insertionsorte für die loxP Sequenzen sorgfältig ausgewählt. Die oberhalb der codierenden Region liegende loxP Sequenz befand sich ca. 2000 bp 5' vom Myf5 Startcodon. Die andere loxP Sequenz wurde in das Intron 1 des Myf5 Gens gesetzt (Abb. 21). Ein entsprechender Zielvektor, der genomische DNA-Abschnitte, die entsprechend positionierten loxP Sequenzen und eine Selektionskassette innerhalb des homologen DNA-Bereichs enthielt, wurde konstruiert und für die Elektroporation von J1 ES-Zellen verwendet (Abb. 22). Rekombinationsereignisse konnten lediglich positiv selektioniert werden. Allerdings erhielt man, wahrscheinlich aufgrund des insgesamt sehr großen homologen Bereichs (9 kb oberhalb, 3 kb unterhalb der Selektionskassette), viele homolog rekombinierte ES-Zellklone. Dies zeigt sich in einer sehr hohen Rekombinationsfrequenz von 1:18.

Die erhaltenen ES-Zellklone wurden für die Generierung von chimären Mäusen eingesetzt. Allerdings konnten zunächst selbst 100 prozentig chimäre Mäuse (d.h. 100 % Agouti Fellfarbe) keine heterozygoten Myf5^{loxP/wt} Nachkommen zeugen (Tab. 6). Entweder waren diese Chimären steril oder zeugten lediglich Wildtyp Mäuse. Dieser Befund stand im Einklang mit Ergebnissen, die von R. Palmiters Arbeitsgruppe erzielt wurden. Mein Zielkonstrukt enthielt neben den positiven Selektionsmarker neo^R den negativen Selektionsmarker HSV-tk. Die Expression der Herpes Simplex Virus Thymidin-Kinase in männlichen Keimzellen resultiert in einer Störung der Spermatogenese. Dieses zeigt sich in einer abnormalen nukleären Morpho-

logie der Spermatide und in der Tatsache, daß reife Spermatozoen in dem Keimepithelium zurückgehalten werden. Beide Prozesse verursachen die Sterilität der männlichen transgenen HSV-tk Mäuse (Braun et al., 1990; Wilkie et al., 1991). Wie meine Ergebnisse zeigen, ist dieser Prozeß zellautonom und hat ansonsten keinen Einfluß auf die Generierung des reproduktiven Systems, da die Wildtyp-Zellen weiterhin Keimbahn-Zellen produzierten (Insgesamt wurden von 9 hochchimären Mäusen 142 Nachkommen generiert, keines davon war agouti.).

Daher wurden die homolog rekombinierten ES-Klone transient mit einem Cre-Expressionsvektor (pMCCre) elektroporiert (Gu et al., 1993). Dieser konnte zwischen den loxP Sequenzen, die die Selektionskassette flankierten, rekombinieren, was in eine Deletion der Selektionskassette resultierte. Auf nicht durchgeführte Rekombinationsereignisse wurde durch FIAU ein negativer Selektionsdruck ausgeübt. Unter den gewählten Bedingungen fand die Rekombination zwischen den beiden äußeren loxP Sequenzen, die eine Deletion der Selektionskassette und des Exon1 von Myf5 bewirkte, etwas häufiger statt als diejenige, die lediglich die Selektionskassette deletierte (47,9 % zu 40,5 %). Die übrigen Thymidin-Kinase negativen ES-Zellklone waren aufgrund von aberranten Deletionsereignissen oder Chromosomenverlusten entstanden (11,6 %). Von den 49 positiven Zelllinien wurden fünf für die Injektion in Blastozysten verwendet.

Drei verschiedene Männchen aus zwei verschiedenen ES-Subklonen (2x 283.7; 1x 283.13) übertrugen das modifizierte Myf5 Allel über ihre Keimbahn. Heterozygote Myf5^{loxP/wt} Mäuse des Stammes #283.7 wurden zur Zucht von homozygoten Myf5^{loxP/loxP} Mäusen eingesetzt.

Der von mir gezüchtete Myf5^{loxP/loxP} Mäusestamm war vital und phänotypisch unauffällig. Die von mir positionierten loxP Sequenzen interferierten daher nicht mit den endogenen Promotor und Enhancer-Elementen, die die Transkription des Myf5 Gens steuerten.

Um zu testen, ob die loxP Sequenzen in dem von mir gezüchteten Mäusestamm auch *in vivo* funktionell waren, wurde ein heterozygotes Myf5^{loxP/wt} Weibchen mit einem transgenen Cre Männchen gekreuzt. Dieses Männchen exprimierte die Cre Rekombinase unter den mit IFN α , IFN β oder synthetischer doppelsträngiger RNA [Polyionisin-Polycytidinsäure (pI:pC)] induzierbaren Mx Promotor (Kühn et al., 1995; Abschnitt 4.2.). Die doppelt heterozygoten Nachkommen wurden mit pI:pC behandelt und anschließend analysiert. Dabei konnte eine Gewebe- und zeitlich abhängige Rekombination in der Leber, der Milz, dem Thymus, der Lunge und der Niere nachgewiesen werden. Die höchsten Rekombinationsraten konnten in der Leber nachgewiesen werden. Im Skelettmuskel konnte mit Ausnahme vom *Musculus masseter* keine Rekombination nachgewiesen werden (Abb. 27). Die Rekombinationsorte entsprachen dem Expressionsmuster der Cre Rekombinase unter der Kontrolle des Mx Promotors. Obwohl dieser Mäusestamm daher für einen „Proof of Concept“ herangezogen werden kann, ist seine

Aktivität in der Skelettmuskulatur nicht so hoch. In anderen Studien konnte eine bis zu 20 %-igen Mx-Promotor Aktivität im Skelettmuskel nachgewiesen werden (Kühn et al., 1995). Durch eine Verbesserung der Induktion durch die direkte Gabe von IFN α bzw. β könnte daher vielleicht ein partieller Muskelphänotyp induziert werden, der eine Analyse von Myf5 in adulten Mäusen ermöglichen würde.

Die Analyse der Myf5 ^{Δ Exon1}/Mx:Cre^(+/-) Maus nach der p(I):p(C) Induktion zeigte eine uneinheitliche Rekombinationsrate von Gewebetyp zu Gewebetyp. Das konnte entweder bedeuten, daß die Cre Rekombinase nur in einem zufälligen Anteil eines Gewebes exprimiert und aktiv war, oder daß die Rekombinase nur in bestimmten Zelltypen eines Gewebes aktiv war. Für die letzte Hypothese sprachen Analysen von transgenen Mäusen, welche die Cre-ER Fusion unter dem CMV Promotor exprimierten (Feil et al., 1996; Brocard et al., 1997). Zunächst wurde die Cre vermittelte Rekombination eines „geflochten“ Gens in diversen Organen und Geweben durch PCR bestimmt. Die ermittelten Rekombinationen variierten in Abhängigkeit des CMV Promotors von Gewebe zu Gewebe und waren niemals 100 %-ig. Dieses Phänomen war ähnlich wie das in der vorliegende Arbeit. Entweder ließ sich die Cre-Fusion innerhalb eines Gewebes nicht vollständig aktivieren, oder der Promotor wurde nicht in allen Zelltypen des Gewebes exprimiert. Um diese Frage zu klären, wurde der CMV:CreER-Mausstamm anschließend mit einem lacZ Reporterstamm gekreuzt. In diesem Mäusestamm war die Translation der β -Galaktosidase erst nach einer Cre/loxP vermittelten Rekombination der stromaufwärts gelegenen, „geflochten“ STOP-Codon Kasette möglich (Akagi et al., 1997). Die Expression der β -Galaktosidase ließ eine genauere Analyse innerhalb eines bestimmten Gewebes zu. So wurde nachgewiesen, daß der scheinbare Chimerismus der Cre Rekombinase Aktivität innerhalb der Epidermis der Maus auf eine beschränkte Expression der Cre Rekombinase in der granulären Schicht der Epidermis zurückzuführen war (Brocard et al., 1997). Innerhalb dieser Schicht fand eine 100 %-ige Cre-vermittelte Rekombination statt. Auf die gesamte Epidermis hochgerechnet beobachtete man aber nur eine ca. 40 %-ige Rekombination. Wahrscheinlich gilt der gleiche Effekt auch für den Mx-Promotor. In Zukunft wird man also noch sehr viel genauer als bisher die Aktivitäten von Zelltyp-spezifischen Promotoren analysieren müssen, bevor man entscheiden kann, ob sie für den gewebespezifischen Einsatz ausreichend sind.

In der Publikation von Kühn (Kühn et al., 1995) wurde für den Mx:Cre Stamm eine gewisse Hintergrundaktivität beobachtet. Diese Hintergrundaktivität konnte in den vorliegenden Studien nicht beobachtet werden. In doppelt heterozygoten Mäusen gab es keine Hintergrundaktivität vor Applikation des exogenen Induktors. Dieser Unterschied ist mit der unterschiedlichen hygienischen Situation in den Tierställen zu erklären. Der Mx-Promotor kann nämlich auch durch endogene Interferone induziert werden. Interferone werden im Zusammenhang mit Infektionen produziert. Unter suboptimalen hygienischen Bedingungen innerhalb eines

Tierstalls kann es daher zu aberranten Aktivierung des Mx:Cre Stammes kommen, ohne daß den Tieren exogener Induktor zugefügt wird.

Als Fazit bleibt festzuhalten, daß die loxP Sequenzen, die das Exon 1 von Myf5 flankieren, *in vivo* von der Cre Rekombinase erkannt und als Substrat akzeptiert wurden. Damit steht ein Mäusestamm für die konditionelle Analyse von Myf5 zur Verfügung.

4.6. Ausblick

Die Cre/loxP Technologie zur Generierung von konditionellen Mutationen in der Maus ist eine noch junge Technologie. Nichtsdestotrotz wird sie in immer breiterem Maße angewandt. Für die Zukunft werden verstärkte Bemühungen notwendig sein, um eine effektive Kontrolle der Cre Aktivität zu gewährleisten. So gibt es bis heute noch keinen Mäuse-Stamm, der eine wirklich verlässliche Gewebe-spezifische Aktivität der Cre Rekombinase garantieren kann.

Die von mir durchgeführten Studien könnten als Schritt hin zu einem künftigen Regulationssystem gewertet werden, das sowohl transkriptionelle als auch posttranslationale Kontrollelemente beinhaltet. Die Verwendung von Zelltyp-spezifischen Promotoren scheint aufgrund der damit einhergehenden unvollständigen Expression innerhalb eines Gewebes aber eher ernüchternd zu sein. Unter diesem Blickwinkel erscheint die in dieser Arbeit verfolgte Strategie, eine inaktive Cre Rekombinase-Fusion konstitutiv zu exprimieren und durch Injektionen eines Induktors lokal, aber vollständig zu induzieren, die richtige und zukunftsweisende zu sein.

Die funktionelle Analyse von Myf5 für Prozesse der Muskelregeneration steht noch bevor. Geeignete Promotoren, welche die Cre Rekombinase in den gewünschten Zellen zum richtigen Zeitpunkt exprimieren, müssen erst noch getestet werden. Sollte das von mir entwickelte kombinierte System zur Regulation der Cre Rekombinase in die Maus transferiert werden, würde es sich sicherlich für Analyse des Myf5 Gens eignen. Derzeitig werden andere Experimente durchgeführt, die noch auf einer gewebespezifischen Expression der Cre Rekombinase basieren. Als mögliche Muskel-spezifische Promotor- und/oder Enhancer-Elemente kommen der Myogenin Promotor und/oder der MyoD Enhancer in Frage. Um Probleme einer möglicherweise bestehenden Redundanz zwischen den myogenen Faktoren Myf5 und MyoD zu analysieren, wird derzeit ein $\text{Myf5}^{\text{loxP/loxP}}/\text{MyoD}^{-/-}$ doppelt homozygoter Mäusestamm gezüchtet.

Im Rahmen der Myogenese ist natürlich auch die Generierung von konditionellen Pax3 Allelen erstrebenswert. Eine Generierung von doppelt konditionellen Mäusen ist derzeit aber noch nicht publiziert worden.

Das Cre/loxP System ist von enormer Bedeutung für alle Wissenschaftler, die sich mit Geninaktivierungen und Mutationsanalysen befassen. Darüber hinaus gibt es weitere sequenzspezifische Rekombinations-Systeme, auf die ich aus Platzgründen nur am Rande eingegangen bin. Eines der am besten untersuchten Alternativen ist das Flp/FRT System aus der Hefe *S. cerevisiae*. Zahlreiche andere sequenzspezifische Rekombinasen wurden zum Teil noch nicht in Säugetierzellen eingesetzt und könnten in der Zukunft mit den bestehenden Rekombinationssystemen kombiniert werden, wie das für die Cre/loxP und Flp/FRT Systeme bereits geschieht (Meyers et al., 1998).

In den kommenden Jahren werden sequenzspezifische Rekombinationssysteme in Säugetieren, zu denen auch der Mensch gehört, den Weg zu neuen, aufregenden Erkenntnissen ebnen.

5. Literaturverzeichnis

Akagi K, Sandig V, Vooijs M, Van der Valk M, Giovannini M, Strauss M, Berns A (1997). Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res*, **25**, 1766-73.

Adra P, Boer M, McBurney MW (1987). Cloning and expression of the mouse pgk-1 gene and the nucleotide sequence of its promotor. *Gene*, **60**, 65-74.

Ahn AH, Kunkel LM (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet*, **3**, 283-91.

Araki H, Jearnpipatkul A, Tatsumi H, Sakurai T, Ushio K, Muta T, Oshima Y (1985). Molecular and functional organization of yeast plasmid pSR1. *Mol Biol*, **182**, 191-203.

Araki K, Araki M, Miyazaki J, Vassalli P (1995). Site-specific recombination of a trans-gene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 160-4.

Argos P (1990). An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *J Mol Biol*, **211**, 943-58.

Argos P, Landy A, Abremski K, Egan JB, Haggard-Ljungquist E, Hoess RH, Kahn ML, Kalionis B, Narayana SV, Pierson LS 3d, Sternberg N, Leong J (1986). The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J*, **5**, 433-40.

Arnold HH, Braun T (1996). Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review. *Int J Dev Biol*, **40**, 345-53.

Askew GR, Doetschman T, Lingrel JB (1993). Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene-targeting tag-and-exchange strategy. *Mol Cell Biol*, **13**, 4115-24.

Auffray JC, Marshall JT, Thaler L, Bonhomme F (1990). Focus on nomenclature of European species of Mus mouse. *Mouse Genome*, **88**, 7-8.

Austin S, Ziese M, Sternberg N (1981). A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell*, **25**, 729-36.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DT, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K (1992). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.

Barinaga M (1994). Knockout mice: round two. *Science*, **265**, 26-28.

Barlow C, Schroeder M, Lekstrom-Himes J, Kylefjord H, Deng CX, Wynshaw-Boris A, Spiegelman BM, Xanthopoulos KG (1997). [Published erratum appears in *Nucleic Acids Res* 1997, 25, 4429] Targeted expression of Cre recombinase to adipose tissue of transgenic mice directs adipose-specific excision of loxP-flanked gene segments. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2543-5.

Beato M, Herrlich P, Schutz G (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, **83**, 851-7.

Berthois J, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (1986). Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 2496-500.

Betz UA, Voshenrich CA, Rajewsky K, Muller W (1996). Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr Biol*, **6**, 1307-16.

Bischoff R (1986). Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture. *Dev Biol*, **115**, 129-39.

Bischoff R, Heintz C (1994). Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev Dyn*, **201**, 41-54.

Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C (1995). Essential role for the c met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*, **376**, 768-71.

Bober E, Lyons GE, Braun T, Cossu G, Buckingham M, Arnold HH (1991). The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J Cell Biol*, **113**, 1255-65.

Borycki AG, Emerson CP (1997). Muscle determination: another key player in myogenesis? *Curr Biol*, **7**, 620-3.

Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature*, **375**, 377-82.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.

Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, **309**, 255-6.

Brasemann S, Graninger P, Busslinger M (1993). A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1657-61.

Braun RE, Lo D, Pinkert CA, Widera G, Flavell RA, Palmiter RD, Brinster RL (1990). Infertility in male transgenic mice: disruption of sperm development by HSV-tk expression in postmeiotic germ cells. *Biol Reprod*, **43**, 684-93.

Braun T, Arnold HH (1994). ES-cells carrying two inactivated myf-5 alleles form skeletal muscle cells: activation of an alternative myf-5-independent differentiation pathway. *Dev Biol*, **164**, 24-36.

Braun T, Arnold HH (1995). Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *EMBO J*, **14**, 1176-86.

Braun T, Arnold HH (1996). Myf-5 and MyoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages. *EMBO J*, **15**, 310-18.

Braun T, Bober E, Rudnicki MA, Jaenisch R, Arnold HH (1994). MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice. *Development*, **120**, 3083-92.

Braun T, Bober E, Winter B, Rosenthal N, Arnold HH (1990). Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J*, **9**, 821-31.

Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, Tannich E, Arnold HH (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J*, **8**, 701-9.

Braun T, Winter B, Bober E, Arnold HH (1990). Transcriptional activation domain of the muscle-specific gene-regulatory protein myf5. *Nature*, **346**, 663-5.

Broach JR, Guarascio VR, Jayaram M (1982). Recombination within the yeast plasmid 2 μ circle is site-specific. *Cell*, **29**, 227-34.

Brocard J, Warot X, Wendling O, Messaddeq N, Vonesch JL, Chambon P, Metzger D (1997). Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14559-63.

Buckingham M, Cossu G (1997). Myogenesis in the mouse embryo. *Methods Cell Biol*, **52**, 29-52.

Capecchi MR (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244**, 1288-92.

Chakravarti D, LaMorte VJ, Nelson MC, Nakajima T, Schulman IG, Juguilon H, Montminy M, Evans RM (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature*, **383**, 99-103.

Chen J, Kubalak SW, Chien KR (1998). Ventricular muscle-restricted targeting of the RXR α gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis. *Development*, **125**, 1943-9.

Chen JD, Evans RM (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, **377**, 454-7.

Cherbas L, Lee K, Cherbas P (1991). Identification of ecdysone response elements by analysis of the *Drosophila* Eip28/29 gene. *Genes Dev*, **5**, 120-31.

Christopherson KS, Mark MR, Bajaj V, Godowski PJ (1992). Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a *Drosophila* ecdysone receptor and chimeric transactivators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6314-8.

Copp AJ (1995). Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet*, **11**, 87-93.

Cossu G, Tajbakhsh S, Buckingham M (1996). How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet*, **12**, 218-23.

Currie PD, Ingham PW (1998). The generation and interpretation of positional information within the vertebrate myotome. *Mech Dev*, **73**, 3-21.

Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG (1992). [Published erratum appears in *EMBO J* 1992, 11, 2366] Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J*, **11**, 1025-33.

Davis JM (1994). *Basic Cell Culture: A Laboratory Approach*. London: IRL Press at Oxford University Press.

Davis RL, Weintraub H, Lassar AB (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, **51**, 987-1000.

Deutscher MP (1990). *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology* 182. San Diego: Academic Press.

Dymecki SM (1996). Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6191-6.

Edmondson DG, Olson EN (1989). [Published erratum appears in *Genes Dev* 1990, 4, 1450] A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev*, **3**, 628-40.

Eilers M, Picard D, Yamamoto KR, Bishop JM (1989). Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature*, **340**, 66-8.

Emami KH, Carey M (1992). A synergistic increase in potency of a multimerized VP16 gene. *Mol Cell Biol*, **4**, 260-7.

Evans MJ, Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, **292**, 154-6.

Evans RM (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 889-95.

Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10887-90.

Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*, **237**, 752-7.

Feinberg AP, Vogelstein B (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Anal Biochem*, **137**, 266-7.

Floss T, Arnold HH, Braun T (1997). A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev*, **11**, 2040-51.

Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans R, Weinberger C (1995). Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*, **81**, 687-93.

Gopaul DN, Guo F, Van Duyne GD (1998). Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination. *EMBO J*, **17**, 4175-87.

Gorman C (1985). *Molecular Cloning II. A Practical Approach*. London: IRL Press at Oxford University Press.

Gossen M, Bujard H (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-51.

Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**, 1766-9.

Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9065-9.

Graham FL, Eb AJ van der (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, **54**, 536-9.

Grass S, Arnold HH, Braun T (1996). Alterations in somite patterning of Myf-5-deficient mice: a possible role for FGF-4 and FGF-6. *Development*, **122**, 141-50.

Green S, Chambon P (1987). Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor. *Nature*, **325**, 75-8.

Grieshammer U, Lewandoski M, Prevette D, Oppenheim RW, Martin GR (1998). Muscle specific cell ablation conditional upon Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice leads to massive spinal and cranial motoneuron loss. *Dev Biol*, **197**, 234-47.

Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, **265**, 103-6.

Gu H, Zou YR, Rajewsky K (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell*, **73**, 1155-64.

Guo F, Gopaul DN, van Duyne GD (1997). Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*, **389**, 40-6.

Hacker A, Guthrie S (1998). A distinct developmental programme for the cranial paraxial mesoderm in the chick embryo. *Development*, **125**, 3461-72.

Haeckel E (1913). *Die Natur als Künstlerin*. Berlin-Charlottenburg: Vita Deutsches Verlags-haus.

Hanks M, Wurst W, Anson-Cartwright L, Auerbach AB, Joyner AL (1995). Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science*, **269**, 679-82.

Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*, **364**, 501-6.

Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, **387**, 733-6.

Hertwig O (1904). *Die Elemente der Entwicklungslehre des Menschen und der Wirbeltiere*. Zweite Auflage. Jena: Gustav Fischer Verlag.

Heymann S, Koudrova M, Arnold H, Köster M, Braun T (1996). Regulation and function of SF/HGF during migration of limb muscle precursor cells in chicken. *Dev Biol*, **180**, 566-78.

Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E (1994). *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Laboratory Press.

Hogan B, Lyons K (1988). Gene targeting: getting nearer the mark. News and Views. *Nature*, **336**, 304-5.

Holub, M (1990). From the intimate life of nude mice. p. 38. In: *The dimension of the present moment*. Trans. D. Habova and D. Young. London: Faber and Faber

Hong H, Kohli K, Trivedi A, Johnson DL, Stallcup MR (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4948-52.

Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, **377**, 397-404.

Horner MA, Chen T, Thummel CS (1995). Ecdysteroid regulation and DNA binding properties of Drosophila nuclear hormone receptor superfamily members. *Dev Biol*, **168**, 490-502.

Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**, 61-8.

Israel DI, Kaufman RJ (1993). Dexamethasone negatively regulates the activity of a chimeric dihydrofolate reductase/glucocorticoid receptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4290-4.

Jones G, Sharp PA (1997). Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13499-503.

Joyner AL (1993). *Gene Targeting. A Practical Approach*. New York: IRL Press at Oxford University Press.

Joyner AL, Herrup K, Auerbach BA, Davis CA, Rossant J (1991). Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the En-2 homeobox. *Science*, **251**, 1239-43.

Joyner AL, Skarnes WC, Rossant J (1989). Production of a mutation in mouse En-2 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, **338**, 153-6.

Kablar B, Krastel K, Ying C, Asakura A, Tapscott SJ, Rudnicki MA (1997). MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. *Development*, **124**, 4729-38.

Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, **85**, 403-14.

Kastner P, Mark M, Chambon P (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*, **83**, 859-69.

Kato N, Aoyama H (1998). Dermomyotomal origin of the ribs as revealed by extirpation and transplantation experiments in chick and quail embryos. *Development*, **125**, 3437-43.

Kato S, Sasaki H, Suzawa M, Masushige S, Tora L, Chambon P, Gronemeyer H (1995). Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements act as promiscuous enhancers for different classes of nuclear receptors. *Mol Cell Biol*, **15**, 5858-67.

Kellendonk C, Tronche F, Monaghan AP, Angrand PO, Stewart F, Schutz G (1996). Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res*, **24**, 1404-11.

Kilby NJ, Snaith MR, Murray JA (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet*, **9**, 413-21.

Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lubbert H, Bujard H (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10933-8.

Koelle MR, Talbot WS, Segraves WA, Bender MT, Cherbas P, Hogness DS (1991). The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*, **67**, 59-77.

Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J*, **5**, 891-7.

Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science*, **269**, 1427-9.

Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*, **19**, 4293.

- Lakso M, Pichel JG, Gorman JR, Sauer B, Okamoto Y, Lee E, Alt FW, Westphal H** (1996). Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5860-5.
- Lam KP, Kühn R, Rajewsky K** (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*, **90**, 1073-83.
- Lasko M, Sauer B, Mosinger B Jr, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H** (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6232-6.
- Lassar AB, Paterson BM, Weintraub H** (1986). Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell*, **47**, 649-56.
- Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D** (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J*, **11**, 1003-13.
- Laughon A, Gesteland RF** (1984). Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 transcriptional activation domain. *EMBO J*, **11**, 5005-12.
- Le Douarin B, Pierrat B, vom Baur E, Chambon P, Losson R** (1995). A new version of the two-hybrid assay for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res*, **23**, 876-8.
- Lewandoski M, Martin GR** (1997). Cre-mediated chromosome loss in mice. *Nat Genet*, **17**, 223-5.
- Lewandoski M, Wassarman KM, Martin GR** (1997). Zp3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line. *Curr Biol*, **7**, 148-51.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R** (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, **69**, 915-26.
- Li L, Zhou J, James G, Heller-Harrison R, Czech MP, Olson EN** (1992). FGF inactivates myogenic helix-loop-helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase C site in their DNA-binding domains. *Cell*, **71**, 1181-94.
- Lin FL, Sperle K, Sternberg N** (1985). Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 1391-5.

Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, Evan GI (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1686-90.

Ma PC, Rould MA, Weintraub H, Pabo CO (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell*, **77**, 451-9.

Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A, Evans RM (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev*, **6**, 329-44.

Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, **83**, 841-50.

Mansour SL, Goddard JM, Capecchi MR (1993). Mice homozygous for a targeted disruption of the proto-oncogene int-2 have developmental defects in the tail and inner ear. *Development*, **117**, 13-28.

Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, **336**, 348-52.

Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 7634-8.

Martin GR, Evans MJ (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 1441-5.

McMahon AP, Bradley A (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, **62**, 1073-85.

McPherson MJ, Hames BD, Tayler GR (1995). *PCR II: A Laboratory Approach*. London: IRL Press at Oxford University Press.

McPherson MJ, Quirke P, Tayler GR (1991). *PCR I: A Laboratory Approach*. London: IRL Press at Oxford University Press.

- McPhie P, Parkison C, Lee BK, Cheng SY** (1993). Structure of the hormone binding domain of human beta 1 thyroid hormone nuclear receptor: is it an alpha/beta barrel? *Biochemistry*, **32**, 7460-5.
- Megeney LA, Kablar B, Garrett K, Anderson JE, Rudnicki MA** (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev*, **10**, 1173-83.
- Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P** (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6991-5.
- Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR** (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet*, **18**, 136-41.
- Michelson AM, Abmayr SM, Bate M, Arias AM, Maniatis T** (1990). Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in Drosophila embryos. *Genes Dev*, **4**, 2086-97.
- Miner JH, Wold B** (1990). Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1089-93.
- Morgan T H** (1919). *The Physical Basis of Heredity*., p.243, J.B. Lippincott Company, 1919.
- Muller HJ** (1920). Variation due to change in the individual gene. *Am Nat*, **56**, 32-50.
- Murre C, McCaw PS, Baltimore D** (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, **56**, 777-83.
- Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D** (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, **58**, 537-44.
- Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I, Nabeshima Y** (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature*, **364**, 532-5.
- Nagy A, Moens C, Ivanyi E, Pawling J, Gertsenstein M, Hadjantonakis AK, Purity M, Rossant J** (1998). Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr Biol*, **8**, 661-4.

Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Birchmeier W, Comoglio PM (1991). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J*, **10**, 2867-78.

Nichols M, Rientjes JMJ, Stewart AF (1998). Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists. *EMBO J*, **17**, 765-73.

No D, Yao TP, Evans RM (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3346-51.

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, **287**, 795-801.

O'Gorman S, Dagenais NA, Qian M, Marchuk Y (1997). Protamine-Cre recombinase transgenes efficiently recombine target sequences in the male germ line of mice, but not in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14602-7.

Olson EN, Arnold HH, Rigby PW, Wold BJ (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell*, **85**, 1-4.

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, **270**, 1354-7.

Orban PC, Chui D, Marth JD (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6861-5.

Ordahl CP, Le Douarin NM (1992). Two myogenic lineages within the developing somite. *Development*, **114**, 339-53.

Oro AE, McKeown M, Evans RM (1990). Relationship between the product of the *Drosophila* ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature*, **347**, 298-301.

Ott MO, Bober E, Lyons G, Arnold H, Buckingham M (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf-5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development*, **111**, 1097-107.

Picard D (1994). Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins. *Curr Opin Biotechnol*, **5**, 511-5.

Picard D, Salser SJ, Yamamoto KR (1988). A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell*, **54**, 1073-80.

Porter A (1998). Controlling your losses: conditional gene silencing in mammals. *Trends Genet*, **14**, 73-9.

Ramirez-Solis R, Liu P, Bradley A (1995). Chromosome engineering in mice. *Nature*, **378**, 720-4.

Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*, **375**, 203-11.

Rawls A, Morris JH, Rudnicki M, Braun T, Arnold HH, Klein WH, Olson EN (1995). [Published erratum appears in Dev Biol 1996, 174, 453] Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis. *Dev Biol*, **172**, 37-50.

Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, **378**, 681-9.

Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C (1973). Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res*, **33**, 3231-8.

Rhodes SJ, Konieczny SF (1989). Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev*, **3**, 2050-61.

Robertson EJ (1987). *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A Practical Approach*. London: IRL Press at Oxford University Press.

Rohlmann A, Gotthardt M, Willnow TE, Hammer RE, Herz J (1996). Sustained somatic gene inactivation by viral transfer of Cre recombinase. *Nat Biotechnol*, **14**, 1562-5.

Roux W (1881). *Der Kampf der Theile im Organismus*. Berlin: Verlag W. Engelmann.

Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell*, **71**, 383-90.

Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, **75**, 1351-9.

Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, **335**, 563-4.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.

Sassoon D, Lyons G, Wright WE, Lin V, Lassar A, Weintraub H, Buckingham M (1989). Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature*, **341**, 303-7.

Sassoon DA (1993). Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis. *Dev Biol*, **156**, 11-23.

Sauer B (1987). Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **7**, 2087-96.

Sauer B, Henderson N (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5166-70.

Sauer B, Henderson N (1989). Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Res*, **17**, 147-61.

Schuermann M, Hennig G, Muller R (1993). Transcriptional activation and transformation by chimaeric Fos-estrogen receptor proteins: altered properties as a consequence of gene fusion. *Oncogene*, **8**, 2781-90.

Schulman IG, Li C, Schwabe JW, Evans RM (1997). The phantom ligand effect: allosteric control of transcription by the retinoid X receptor. *Genes Dev*, **11**, 299-308.

Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, **75**, 567-78.

Schwenk F, Baron U, Rajewsky K (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res*, **23**, 5080-1.

Schwenk F, Kühn R, Angrand PO, Rajewsky K, Stewart AF (1998). Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1427-32.

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, **244**, 1578-80.

Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, **317**, 230-4.

Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA (1998). *Cells: A Laboratory Manual*, Vol 1. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Spemann H (1933). *Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung*. S. 275, Deutsche Ausgabe der Silliman Lectures, gehalten an der Yale University im Spätjahr 1933; Berlin: J. Springer Verlag, 1936, Nachdruck 1968.

Spencer DM (1996). Creating conditional mutations in mammals. *Trends Genet*, **12**, 181-7.

Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, Narusawa M, Leferovich JM, Sladky JT, Kelly AM (1991). The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, **352**, 536-9.

Sternberg N, Hamilton D, Austin S, Yarmolinsky M, Hoess R (1981). Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **45**, 297-309.

Stevens LC, Little CC (1954). Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **40**, 1080-7.

Stockdale FE (1992). Myogenic cell lineages. *Dev Biol*, **154**, 284-98.

St-Onge L, Furth PA, Gruss P (1996). Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Res*, **24**, 3875-7.

Tajbakhsh S, Rocancourt D, Buckingham M (1996). Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature*, **384**, 266-70.

Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M (1997). Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell*, **89**, 127-38.

Taketo M, Schroeder AC, Mobraaten LE, Gunning KB, Hanten G, Fox RR (1991). FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 2065-9.

Talbot WS, Swyryd EA, Hogness DS (1993). Drosophila tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*, **73**, 1323-37.

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*, **280**, 1614-7.

Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H, Lassar AB (1988). MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science*, **242**, 405-11.

Taylor SM, Jones PA (1979). Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*, **17**, 771-9.

Thomas HE, Stunnenberg HG, Stewart AF (1993). Heterodimerization of the Drosophila ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature*, **362**, 471-5.

Thomas KR, Capecchi MR (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, **51**, 503-12.

Thomas KR, Capecchi MR (1990). Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature*, **346**, 847-50.

Thummel CS (1995). From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of Drosophila nuclear receptor superfamily members. *Cell*, **83**, 871-7.

Torres RM, Kühn R. (1997). *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*. New York: Oxford University Press.

Triezenberg SJ, LaMarco KL, McKnight SL (1988). Evidence of DNA: protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. *Genes Dev*, **2**, 730-42.

Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ, Mayford M, Kandel ER, Tonegawa S (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*, **87**, 1317-26.

Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell*, **65**, 1255-66.

Valancius V, Smithies O (1991). Testing an "in-out" targeting procedure for making subtle genomic modifications in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **11**, 1402-8.

Vivat V, Zechel C, Wurtz JM, Bourguet W, Kagechika H, Umemiya H, Shudo K, Moras D, Gronemeyer H, Chambon P (1997). A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers. *EMBO J*, **16**, 5697-709.

von Baer C E (1849). Über die Entwicklungsgeschichte der Tiere. Beobachtung und Reflexion. Band 1. S.231. Berlin.

Wagner KU, Wall RJ, St-Onge L, Gruss P, Wynshaw-Boris A, Garrett L, Li M, Furth PA, Hennighausen L (1997). Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4323-30.

Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ (1995). A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*, **378**, 690-7.

Wang Y, Krushel LA, Edelman GM (1996). Targeted DNA recombination in vivo using an adenovirus carrying the cre recombinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3932-6.

Wang Y, O'Malley BW Jr, Tsai SY, O'Malley BW (1994). A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8180-4.

Webster NJ, Green S, Jin JR, Chambon P (1988). The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell*, **54**, 199-207.

Weintraub H (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell*, **75**, 1241-4.

Weintraub H, Davis R, Lockshon D, Lassar A (1990). MyoD binds cooperatively to two sites in a target enhancer sequence: occupancy of two sites is required for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5623-7.

Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S, Zhuang Y, Lassar A (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*, **251**, 761-6.

Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, Miller AD (1989). Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5434-8.

Wilkie TM, Braun RE, Ehrman WJ, Palmiter RD, Hammer RE (1991). Germ-line intrachromosomal recombination restores fertility in transgenic MyK-103 male mice. *Genes Dev*, **5**, 38-48.

Wright WE, Sassoon DA, Lin VK (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell*, **56**, 607-17.

Wu H, Liu X, Jaenisch R (1994). Double replacement: strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine Colla-1 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2819-23.

Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol*, **3**, 87-94.

Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ (1994). Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol*, **164**, 588-603.

Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature*, **366**, 476-9.

Yao TP, Ku G, Zhou N, Scully R, Livingston DM (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10626-31.

Yao TP, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, **71**, 63-72.

Zhang Y, Riesterer C, Ayrall AM, Sablitzky F, Littlewood TD, Reth M (1996). Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, **24**, 543-8.

Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R (1990). Beta 2 - microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature*, **344**, 742-6.

Zinyk DL, Mercer EH, Harris E, Anderson DJ, Joyner AL (1998). Fate mapping of the mouse midbrain-hindbrain constriction using a site-specific recombination system. *Curr Biol*, **8**, 665-8.

Zweigerdt R, Braun T, Arnold HH (1997). Faithful expression of the Myf-5 gene during mouse myogenesis requires distant control regions: a transgene approach using yeast artificial chromosomes. *Dev Biol*, **192**, 172-80.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Studien zur Generierung eines Zelltyp-spezifischen und zeitlich regulierbaren Rekombinationssystems *in vivo* in der Maus durchgeführt. Sie stellen die Voraussetzung für einen „konditionellen Knock-Out“ eines beliebigen Gens *in vivo* dar.

Die Verfahren zur homologen Rekombination von ES-Zellen und deren anschließenden Transfer in Maus-Blastozysten ermöglicht im Prinzip die funktionelle Analyse jedes Gens *in vivo* in der Maus. In manchen Fällen resultiert die Ausschaltung eines Gens jedoch in einen letalen Phänotyp, was seine Analyse zu späteren Entwicklungsstadien ausschließt. Exakt diese Situation fand man bei der Ausschaltung des myogenen Faktors Myf5 vor. Homozygote Myf5^{-/-} Mäuse starben bei ihrer Geburt aufgrund einer schweren Rippenmißbildung. Dieses verhinderte die Analyse des Myf5 Gens zu späteren Entwicklungsphasen der Maus und in Prozessen der Muskelregeneration.

Daher wurde in embryonalen Stammzellen ein gefloxtes Myf5 Allel generiert, das eine konditionelle Mutagenese von Myf5 mit dem Cre/loxP System aus dem Bakteriophagen P1 ermöglicht. Die sequenzspezifische Rekombinase Cre kann dabei zwischen zwei loxP Sequenzen rekombinieren und eine Deletion des dazwischen liegenden DNA-Abschnitts bewirken. Aus den embryonalen Stammzellen konnte ein Myf5^{loxP/loxP} Mausstamm erzeugt werden. Wie erwartet, waren homozygote Myf5^{loxP/loxP} Mäuse lebensfähig und konnten für die konditionelle Mutagenese eingesetzt werden. Die Kreuzung von Myf5^{loxP(+/-wt)} Mäusen mit transgenen Mx:Cre Mäusen wiesen die Funktionalität der loxP Sequenzen nach und führten zu einem zeitabhängigen und gewebespezifischen „Knock-Out“ des Myf5 Gens *in vivo*.

In einem weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* Studien zur Regulation der Cre Rekombinase durchgeführt. Dabei konnte die Cre Aktivität durch eine Kombination transkriptioneller und posttranslationaler Kontrollelemente wirksam reguliert werden. Diese Regulation beruhte auf der Verwendung des Ecdyson-Rezeptors aus *D. melanogaster*. Die spezifische Interaktion zwischen dem Rezeptor und seinem Liganden Muristerone A resultierte dabei in der transkriptionellen Aktivierung eines Ecdyson-responsiven Promotors, der die Expression einer Cre-Fusion steuerte. Das aktive Zentrum dieser Cre-Fusion war durch eine modifizierte E-Domäne des Ecdyson-Rezeptors maskiert. Die Aktivierung dieses posttranslationalen Kontrollelements war ebenfalls von Muristerone A abhängig. Das Kombinationssystem reduzierte die Hintergrundaktivität der Cre Rekombinase und erwies sich sowohl in einer etablierten Fibroblastenzelllinie als auch in ES-Zellen als ausreichend für eine Aktivierung der Cre Rekombinase.

7. Summary

Towards the Generation of a Cell-type Specific and Conditional Active Recombination system in mice *in vivo*

Conventional knock-out strategies in mice lead to a constitutive inactivation of the gene of interest. Ideally, the resulting phenotype serves as an indicator of the gene's original function. However, very often null mutations of genes which might have important functions in later life result in embryonic lethality thereby preventing analysis of the gene's functions in physiological and pathological processes later in life.

This problem was encountered when *myf5*, a muscle regulatory transcription factor, was mutated. Resulting mice died perinatally due to rib malformation preventing analysis of *myf5* in muscle regeneration and generation of muscle subtype formation.

A strategy which is based on the *Cre/loxP* system was developed to assess *myf5* function *in vivo* in more detail.

In a first step the *Cre/loxP* system has been revised to improve its regulation. Therefore a model has been developed in which *Cre* activity is controlled both by a transcriptional and a posttranslational mechanism. Both check points are ultimately commanded by *Ecdysone*, a steroid receptor ligand from *D. melanogaster*. The transcriptional control is based on an amendment of R. Evans inducible system and is achieved on binding of *Ecdysone* to a *RXR/Ecdysone*-receptor fusion which then binds to its cognate DNA-binding sequence.

The posttranslational control is accomplished by fusing the *Cre* recombinase to the HBD-domain of the *Ecdysone* receptor. The HBD domain used carried a small N-terminal deletion to confer its properties onto the fusion protein. All fusions were shown to bind to *Ecdysone* in competition assays. The *Cre* recombinase was successfully controlled by the combinatory system in an established fibroblastoid cell line as well as in ES-cells. Aspects of induction were assessed in a transient transfection assay using the pPGK^{*loxP*}*STOP*^{*loxP*}*LacZ* (pPGKpaX1 \equiv pPac1) construct.

In a second step a floxed *myf5*^{*loxP/wt*} ES cell line was generated. This was used to generate homozygous *myf5*^{*loxP/loxP*} mice. The resulting mice were vital and phenotypically normal. By crossing these mice to a transgenic *Mx:Cre* strain an inducible and tissue specific *Cre/loxP* mediated recombination process occurred at the *myf5* locus *in vivo*.